



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

Διευθυντής : Καθηγητής ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Ι. ΔΑΠΟΝΤΕ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Διευθυντής: Καθηγητής ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΒΑΜΒΑΚΟΠΟΥΛΟΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ»

Διευθυντής ΠΜΣ : ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Ι. ΔΑΠΟΝΤΕ, Καθηγητής Πανεπιστημίου  
Θεσσαλίας

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

<< Επίδραση της χορήγησης Vitamin D συγκέντρωσης 0,1nM στη  
διαδικασία της κατάψυξης (Vitrification) δειγμάτων σπέρματος >>

ΚΑΛΤΣΟΥΝΑΚΗ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΑ  
ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΟΣ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΣΤΡΙΑ

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των  
απαιτήσεων για την απόκτηση του  
Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης

ΛΑΡΙΣΑ

Οκτώβριος 2017

**Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής:**

**1<sup>ος</sup> Εξεταστής  
(Επιβλέπων)**

**Ανυφαντής Γεώργιος - Σπυρίδων**  
Επίκουρος Καθηγητής Εμβρυολογίας

**2<sup>ος</sup> Εξεταστής**

**Μουλάς Ανάργυρος**  
Καθηγητής Τ.Ε.Ι. Θεσσαλίας

**3<sup>ος</sup> Εξεταστής**

**Δαπόντε Ι. Αλέξανδρος**  
Καθηγητής Μαιευτικής κ Γυναικολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Φτάνοντας στο τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους αυτούς που βοήθησαν για την εκπόνηση της πτυχιακής μου εργασίας, αλλά και τον καθένα ξεχωριστά που με τον τρόπο του και τις γνώσεις του κατάφερε να με οδηγήσει στην επιτυχημένη ολοκλήρωση της.

Αρχικά, ευχαριστώ θερμά τον διευθυντή του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών << Βιολογία της Αναπαραγωγής >> και Καθηγητή Μαιευτικής κ Γυναικολογίας, κ Δαπόντε Ι. Αλέξανδρο για την συνεργασία του και την κατανόηση του, καθώς και για την ευκαιρία που μου έδωσε να συμμετέχω στο συγκεκριμένο μεταπτυχιακό και εργαστήριο.

Τον καθηγητή Τ.Ε.Ι. Θεσσαλίας, κ Μουλά Ανάργυρο, που συμβούλευε και καθοδηγούσε αυτή την προσπάθεια από την αρχή, καθώς και για τον πολύτιμο χρόνο που διέθεσε.

Τον εμβρυολόγο του τμήματος και Επίκουρο Καθηγητή Εμβρυολογίας, κ Ανυφαντή Γεώργιο- Σπυρίδων, που με βοήθησε στην συλλογή των δειγμάτων, που με τις συμβουλές της ολοκληρώθηκε επιτυχώς αυτή η εργασία, καθώς επίσης και για την ευκαιρία που μου έδωσε ως βοηθός του να αγαπήσω το εργαστήριο και να αποκτήσω πολύτιμες γνώσεις.

Επίσης, ευχαριστώ το προσωπικό της Μονάδας Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας που συνέβαλε στη περαιτέρω απόκτηση γνώσεων και εμπειρίας σε γενικό και ειδικό επίπεδο.

Ευχαριστώ θερμά τα άλλα τρία παιδιά του εργαστηρίου, που με την συμπαράσταση, την βοήθεια τους και τα αστεία τους, κατάφερα να ολοκληρώσω την εργασία μου, περνώντας ευχάριστο και ποιοτικό χρόνο στο εργαστήριο. Και πιο συγκεκριμένα την Δρίβα Άννα-Μαρία μαζί με την οποία ολοκληρώσαμε το πείραμα μας με επιτυχία.

Δεν μπορώ φυσικά να ξεχάσω να ευχαριστήσω ολόψυχα τους φίλους μου αλλά και τους καινούργιους φίλους, που ήταν δίπλα μου σε κάθε προσπάθεια που έκανα και σε κάθε απόφαση που έπαιρνα. Πέρασαμε εκπληκτικά και σας ευχαριστώ για αυτό.

Και για το τέλος, ένα τεράστιο ευχαριστώ στην οικογένεια μου, και συγκεκριμένα στους γονείς μου, Γιάννη και Ράνια, και στην αδερφή μου, Βίκη, που όλο αυτόν τον χρόνο ήταν δίπλα μου, μου συμπαραστάθηκαν και οικονομικά και ψυχικά, χωρίς αντάλλαγμα, πέσεις και άπιαστες προσδοκίες άλλα με απεριόριστη αγάπη και κατανόηση. Σας ευχαριστώ μέσα από την καρδιά μου.

Με εκτίμηση,  
Καλτσουνάκη Κωνσταντία



## ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΚΑΛΤΣΟΥΝΑΚΗ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΑ

Μόνιμος κάτοικος: Μακεδονομάχων 46, Αλεξάνδρεια Ημαθίας, Ελλάδα TK 59300

2333027224 6980761588 kaltina@windowslive.com

Φύλο: Θήλυ | Ημερομηνία γέννησης: 30/12/1993 | Εθνικότητα: Ελληνική

### ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

1-6-2014 έως 31-08-2014 : Τρίμηνη απασχόληση στο βιοχημικό εργαστήριο του Γενικού Νοσοκομείου Ιπποκράτειο Θεσσαλονίκης, Πλήρης εβδομαδιαία εκμάθηση και απασχόληση στα βιοχημικά εργαστήρια

Σεπτέμβριος 2014 έως Σεπτέμβριος 2016 : Παρακολούθηση και συμμετοχή στα εργαστήρια εξωσωματικής γονιμοποίησης του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Αλεξανδρούπολης, υπό την διεύθυνση του καθηγητή Γεωργίου Γαλάζιου.

Ως βοηθητικό προσωπικό του εργαστηρίου υπό την εποπτεία της Εμβρυολόγου του εργαστηρίου συμμετοχή στην προετοιμασία σπέρματος για IVF/ICSI/IUI, στην εκτίμηση του αριθμού και της κινητικότητας του σπέρματος, στην προετοιμασία του εργαστηρίου σε κάθε κύκλο εξωσωματικής γονιμοποίησης (πιάτα ωοληψίας, καλλιέργειας εμβρύων κ.α.) και εκπαίδευση στην οργάνωση της κρυοτράπεζας του εργαστηρίου

Φεβρουάριος 2016 έως Σεπτέμβριος 2016 : Απασχόληση σε εταιρεία με ναυτιλιακά είδη ως υπάλληλος γραφείου και διαχείρισης λογιστικών θεμάτων

Σεπτέμβριος 2016 έως Οκτώβριος 2017 : Συμμετοχή στο πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας του τμήματος Ιατρικής με τίτλο

“Βιολογία της Αναπαραγωγής”

### ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΡΤΙΣΗ

2011 έως 2015 : Απόφοιτη του Τμήματος Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης, Αλεξανδρούπολη

Βαθμός πτυχίου : 6,90 ( έξι και ενενήντα εκατοστά )

2008 έως 2011 : Απόφοιτη Γενικού Λυκείου

2ο Λύκειο Αλεξανδρείας, Βαθμός Απολυτηρίου: 18

Μητρική γλώσσα : ΕΛΛΗΝΙΚΗ

ΑΓΓΛΙΚΑ : BULATS ( LEVEL C1), MICHIGAN, EDEXCEL LEVEL 3, UCLAN EDEXCEL LEVEL 2

ΓΕΡΜΑΝΙΚΑ : GOETHE-ZERTIFIKAT B1 , ZERTIFIKAT DEUTSH ZEUGNIS

Δεξιότητες πληροφορικής : Πτυχίο H/Y ECDL, καθημερινή χρήση e-mail και Internet

### Προγράμματα/Συνέδρια

- Πρόγραμμα επαγγελματικής κατάρτισης και εμπειρίας μέσω ΕΣΠΑ στο Ιπποκράτειο Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης
- 65ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας , 28-30 Νοεμβρίου 2014, Θεσσαλονίκη
- 24ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, 06-08 Δεκεμβρίου 2013, Αθήνα
- 36ο Ενιαίο Επιστημονικό Συνέδριο, Ε.Ε.Β.Ε., 08-10 Μαΐου 2014, Ιωάννινα
- International Conference on Sexually Transmitted Viral Infections : Current Diagnostic and Therapeutic Approaches, 15-17 Νοεμβρίου 2013, Αλεξανδρούπολη
- 5ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γονιμότητας και Στεριότητας, 9-11 Δεκεμβρίου 2016, Θεσσαλονίκη

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΤΡΙΤΟΒΑΘΜΙΑΣ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗΣ : ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΜΥΛΛΕΡΙΟΥ ΟΡΜΟΝΗΣ (ANTIMULLERIAN HORMONE –AMH) ΜΕ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΣΕ ΓΥΝΑΙΚΕΣ ΜΕ ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΠΟΛΥΚΥΣΤΙΚΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ : ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ D ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ 0,1nM ΣΤΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΗΣ ΚΑΤΑΨΥΞΗΣ (VITRIFICATION) ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ



# «ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ»

ΚΑΛΤΣΟΥΝΑΚΗ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΑ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2017

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ  
ΣΠΟΥΔΩΝ

ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Ι. ΔΑΠΟΝΤΕ  
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΑΣ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων: Ανυφαντής Γεώργιος - Σπυρίδων  
Επίκουρος Καθηγητής Εμβρυολογίας

Σύμβουλος : Μουλάς Ανάργυρος  
Καθηγητής Τ.Ε.Ι. Θεσσαλίας

Μέλος : Δαπόντε Ι. Αλέξανδρος  
Καθηγητής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ανδρική υπογονιμότητα, η οποία συμβάλλει στην αδυναμία τεκνοποίησης ενός ζευγαριού, οφείλεται σε ποικίλες αιτίες μερικές από τις οποίες μπορεί να προκύπτουν από τον τρόπο ζωής και την διατροφή. Η βιταμίνη D είναι μια λιποδιαλυτή βιταμίνη η οποία σχηματίζεται στον οργανισμό κυρίως μέσω της απορρόφησης της ηλιακής υπεριώδους ακτινοβολίας από το δέρμα, αλλά και από ορισμένες τροφές πλούσιες στη βιταμίνη. Η κύρια δράση της βιταμίνης D είναι η αύξηση του επιπέδου του ασβεστίου στο αίμα μέσω της προώθησης της απορρόφησης του ασβεστίου και του φωσφόρου από το έντερο, καθώς και μέσω της απελευθέρωσης των μετάλλων αυτών από τα οστά. Η δραστική μορφή της βιταμίνης προκύπτει από τον μεταβολισμό της μέσω διαφόρων ενζύμων και η δράση της μεσολαβεί από τον διαμεμβρανικό της υποδοχέα, VDR, και τα μονοπάτια που αυτός ενεργοποιεί. Ο VDR έχει ανιχνευτεί σε αρκετές δομές των σπερματοζωαρίων, στα οποία επάγει και μη-γονιδιακές αλλαγές, καθώς το DNA του σπερματοζωαρίου είναι πολύς συμπυκνωμένο. Οι αλλαγές που επάγονται κυρίως από την συνεργιστική δράση βιταμίνης D-VDR είναι ωφέλιμες για το σπέρμα, καθώς αυξάνει την κινητικότητα του σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις. Αυτή την ευεργετική επίδραση εξετάσαμε και εμείς στο συγκεκριμένο πείραμα στα πλαίσια της διαδικασίας της κατάψυξης που από μόνη της αποδείχθηκε επιζήμια για την κινητικότητα και την βιωσιμότητα των σπερματοζωαρίων. Για τον λόγο αυτό εξετάστηκαν 18 δείγματα σπέρματος ανδρών χωρίς και με την επίδραση της βιταμίνης D σε τελικές συγκεντρώσεις 0,01nM και 0,1nM και ύστερα από την διαδικασία κατάψυξης-απόψυξης. Τα αποτελέσματα δείχνουν μείωση της προωθητικής κίνησης και της ακινησίας στην συγκέντρωση 0,01nM, η οποία είναι στατιστικά σημαντική, ενώ στην συγκέντρωση 0,1nM τα ίδια ποσοστά δεν έδειξαν κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά. Η συγκρίσεις έγιναν με τα δείγματα ελέγχου μετά την απόψυξη.

## SUMMARY

Male infertility, which contributes to some extent to the inability of a couple to acquire a child, is due to a variety of causes, some of which may arise from lifestyle and diet. Vitamin D is a fat-soluble vitamin that is formed in the body mainly by the absorption of solar ultraviolet radiation from the skin, but also by some vitamin-rich foods. The main effect of vitamin D is to increase the level of calcium in the blood by promoting the absorption of calcium and phosphorus from the intestine, as well as by releasing these minerals from bones. The active form of vitamin results from its metabolism through various enzymes and its action is mediated by its transmembrane receptor, VDR, and the pathways it activates. VDR has been detected in several sperm structures, which also induce non-genomic changes, as sperm DNA is highly condensed. The changes induced mainly by the synergistic effect of vitamin D-VDR are beneficial to sperm as it increases its motility at specific concentrations. This beneficial effect was also examined by us in this experiment in the freezing process which itself proved to be detrimental to the motility and viability of sperm. For this reason, 18 sperm samples of men were tested without and with the effect of vitamin D at final concentrations of 0.01nM and 0.1nM and after the freezing-thawing process. The results show a decrease in promotional and immobility in the concentration of 0.01nM, which is statistically significant, while at the concentration of 0.1nM the same percentages did not show any statistically significant difference. Comparisons were made with control samples after thawing.



# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	9
1.1	ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ .....	9
1.2	ΑΝΔΡΙΚΗ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ.....	11
1.3	ΑΙΤΙΑ ΑΝΔΡΙΚΗΣ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑΣ.....	12
2	ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΟΥ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ .....	16
2.1	ΛΗΨΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ.....	17
2.2	ΜΑΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ.....	18
2.3	ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ.....	20
2.4	ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ.....	22
3	ΒΙΤΑΜΙΝΕΣ.....	24
3.1	ΓΕΝΙΚΑ .....	24
3.2	ΒΙΤΑΜΙΝΗ D – ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΗΣ .....	26
3.3	ΒΙΤΑΜΙΝΗ D ΚΑΙ ΣΠΕΡΜΑ.....	30
4	ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ.....	31
4.1	ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ .....	32
4.2	ΑΠΟΨΥΞΗ .....	35
4.3	ΚΡΥΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΑ.....	36
4.4	ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ, ΣΠΕΡΜΑ ΚΑΙ ΒΙΤΑΜΙΝΗ D .....	38
5	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	41
5.1.1	ΑΣΘΕΝΕΙΣ.....	41
5.1.2	ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ.....	41
5.1.3	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ.....	41
6	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	44
6.1	ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΩΝ.....	44
6.2	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ.....	45
6.3	ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	45
	.....	47
7	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	48
8	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	51

# 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ

Ως υπογονιμότητα ορίζεται η αδυναμία επίτευξης εγκυμοσύνης μετά από χρονικό διάστημα ενός χρόνου τακτικών σεξουαλικών επαφών, χωρίς χρήση αντισυλληπτικών μέσων. Στειρότητα ονομάζεται η απόλυτη ανικανότητα για την πραγματοποίηση της σύλληψης και η οποία μπορεί να είναι αναστρέψιμη ή μη. Κατά μέσο όρο 20-25% των ζευγαριών που δεν χρησιμοποιούν αντισύλληψη θα πετύχουν εγκυμοσύνη μέσα στον πρώτο μήνα. Το 50% περίπου των ζευγαριών θα πετύχουν εγκυμοσύνη μέσα στους 3-5 πρώτους μήνες, ενώ το 85% μέσα στους πρώτους 12 μήνες.

Σύμφωνα με τον ορισμό όπως αυτός έχει διατυπωθεί από τον [Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας \(Π.Ο.Υ.\)](#), η υπογονιμότητα αποτελεί διαταραχή της υγείας και χρήζει ειδικής αντιμετώπισης. Η τεκνοποίηση και η δημιουργία οικογένειας θεωρούνται δικαίωμα του κάθε ζευγαριού. Σύμφωνα με διάφορες επιδημιολογικές μελέτες και εκτιμήσεις του Π.Ο.Υ., περίπου το 10 - 12% των ζευγαριών που βρίσκονται σε αναπαραγωγική ηλικία αντιμετωπίζει κάποιας μορφής δυσχέρεια στην προσπάθειά του να αποκτήσει απογόνους. Περίπου το 60 - 65% των φυσιολογικών γόνιμων ζευγαριών επιτυγχάνει κύηση κατά το πρώτο έτος προσπαθειών και 20 - 25% των ζευγαριών αυτών επιτυγχάνει κύηση κατά το δεύτερο έτος προσπαθειών. Το υπόλοιπο 15% είναι τα «υπογόνιμα» ζευγάρια που χρήζουν ειδικής βοήθειας.

Γενικά η υπογονιμότητα οφείλεται σε παθήσεις της γυναίκας σε ποσοστό 30-40% περίπου, σε παθήσεις του άντρα σε ποσοστό 20-30% και σε παθήσεις και των δύο συντρόφων σε ποσοστό 30%. Σε ένα ποσοστό 10-15% των ζευγαριών με πρόβλημα υπογονιμότητας δεν μπορεί να βρεθεί σαφής αιτία. Αυτή η ομάδα υποφέρει από ανεξήγητη ή ιδιοπαθή υπογονιμότητα. Ένα σημαντικό αίτιο υπογονιμότητας το οποίο αναγνωρίζεται όλο και περισσότερο τα τελευταία χρόνια είναι η ηλικία της συζύγου. Φυσιολογικά η γονιμότητα των γυναικών ελαττώνεται δραματικά μετά από την ηλικία των 35 ετών. Τα τελευταία χρόνια λόγω αλλαγών των κοινωνικών συνθηκών οι γυναίκες αναβάλλουν την ηλικία τεκνοποίησης. Ως αποτέλεσμα ένα σημαντικό ποσοστό ζευγαριών παρουσιάζουν υπογονιμότητα λόγω προχωρημένης ηλικίας της γυναίκας.

Οι κυριότερες αιτίες υπογονιμότητας είναι ο ανδρικός παράγοντας (κιρσοκήλη, διαταραχές μεταφοράς σπέρματος, διαταραχές υπόφυσης/υποθαλάμου) , οι διαταραχές ωοθυλακιορρηξίας (σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών, πρόωμη ωοθηκική έκπτωση), ο σαλπινγικός-περιτοναϊκός παράγοντας (συμφύσεις, διαταραχές ανατομίας σαλπίγγων) και η ενδομητρίωση, παράγοντες που αφορούν τη μήτρα (πολύποδες, συγγενείς ανωμαλίες), τραχηλικοί παράγοντες (διαταραχές τραχηλικής βλέννης) και ιδιοπαθής υπογονιμότητα.

Η εκτίμηση του ζευγαριού θα πρέπει να κατευθύνεται στην αναγνώριση της αιτίας της υπογονιμότητας με συστηματικό, γρήγορο και οικονομικό τρόπο, έτσι ώστε να αναγνωριστούν όλοι οι σχετικοί παράγοντες, με κύρια έμφαση στις λιγότερο επεμβατικές μεθόδους και πρώτο στόχο τις πιο κοινές αιτίες υπογονιμότητας. Τα βήματα και η έκταση της διαγνωστικής εκτίμησης θα εξαρτηθούν από την επιθυμία του ζευγαριού, την ηλικία της γυναίκας, τη διάρκεια της υπογονιμότητας και ιδιαίτερα χαρακτηριστικά που προκύπτουν από το ιστορικό και τη φυσική εξέταση. Η θεραπευτική αντιμετώπιση του υπογόνιμου ζευγαριού επικεντρώνεται στην επιμέρους αιτιολογία της υπογονιμότητας. Πολλές φορές όμως ανεξάρτητα από αυτό απαιτείται η χρήση τεχνικών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής όταν όλες οι άλλες μέθοδοι έχουν αποτύχει. Η πιο συχνή μέθοδος υποβοηθούμενης αναπαραγωγής είναι η εξωσωματική γονιμοποίηση που χρησιμοποιείται ευρύτατα στις μέρες μας για την αντιμετώπιση της υπογονιμότητας.



## 1.2 ΑΝΔΡΙΚΗ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ

Ο ανδρικός παράγων είναι υπεύθυνος αποκλειστικά ή εν μέρει για την υπογονιμότητα του 45% περίπου των ζευγαριών. Στη διερεύνηση της αντρικής υπογονιμότητας, πρωταρχικό ρόλο παίζει η σωστή λήψη ιατρικού ιστορικού και η κλινική εξέταση. Κατά τη λήψη του ιστορικού, ο ιατρός θα ρωτήσει για την ύπαρξη ασθενειών, όπως ο σακχαρώδης διαβήτης, η παρωτίτιδα, προηγηθέν χειρουργείο στο ανδρογεννητικό σύστημα, καθώς και σεξουαλικό ιστορικό. Επίσης, ο άντρας θα ερωτηθεί εάν έχει ή είχε επαφή με βλαπτικούς περιβαλλοντικούς-εργασιακούς παράγοντες, όπως οργανικά διαλύματα, προϊόντα ελαίων, βαφές και βαρέα μέταλλα, καθώς επίσης και αν έλαβε κάποια φαρμακευτική αγωγή. Ορισμένα φάρμακα που έχει αποδειχτεί ότι μπορούν να επηρεάσουν τη σπερματογένεση είναι η σπιρονολακτόνη (διουρητικό), αναστολείς διαύλων ασβεστίου (αντι-υπερτασικό), αντι-ανδρογόνα, νιτροφουραντοΐνη (αντιβιοτικό) σε υψηλή δόση, σιμετιδίνη (γαστροπροστατευτικό), κυκλοσπορίνη (ογκολογικό), κολχικίνη (αντιφλεγμονώδες) και ερυθρομυκίνη (αντιβιοτικό). Κατά την κλινική εξέταση, ο ιατρός θα ελέγξει το πέος, το όσχεο, μέσα στο οποίο βρίσκονται και οι όρχεις, την επιδιδυμίδα και τον σπερματικό πόρο που αποτελεί την οδό διέλευσης του σπέρματος από τους όρχεις και την επιδιδυμίδα προς την ουρήθρα. Τέλος, θα εξεταστούν και τα δευτερογενή σεξουαλικά χαρακτηριστικά, όπως η τριχοφυΐα, η μυϊκή μάζα και η χροιά της φωνής.

Βασικό εργαλείο στον έλεγχο της γονιμότητας του άντρα είναι το σπερμοδιάγραμμα. Πρέπει να γίνεται από εξειδικευμένα άτομα και βασικά χαρακτηριστικά του είναι ο όγκος του σπέρματος, η συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων ανά ml σπέρματος, ο συνολικός αριθμός των σπερματοζωαρίων και η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων. Το σπέρμα εξετάζεται κάτω από μικροσκόπιο για να προσδιορισθεί ο αριθμός και η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων καθώς και να εκτιμηθεί το ποσοστό των φυσιολογικών τους μορφών και άλλες εξειδικευμένες παράμετροι. Επειδή η εξέταση του σπέρματος στον ίδιο άντρα μπορεί να ποικίλει σε μεγάλο βαθμό μέσα στον χρόνο είναι πιθανό να χρειαστεί περισσότερα από ένα σπερμοδιαγράμματα. Από τον έλεγχο στον οποίο πρέπει να υποβληθεί ο άντρας θα εκτιμηθεί το μέγεθος του προβλήματος και έτσι θα προσδιορισθεί η ενδεδειγμένη θεραπεία. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι δεν υπάρχουν σαφή όρια μεταξύ «φυσιολογικού» και «παθολογικού» σπερμοδιαγράμματος, τα οποία θα αναφερθούν παρακάτω.

Η ανδρική υπογονιμότητα είναι πρόβλημα που πρέπει να αντιμετωπίζεται σε συνεργασία από ουρολόγο, ενδοκρινολόγο, ακτινολόγο - υπερηχογραφιστή, μικροβιολόγο με εξειδίκευση στην αξιολόγηση σπέρματος ή ειδικό βιολόγο-εμβρυολόγο, πυρηνικό ιατρό για τις ορμονικές αναλύσεις και φυσικά θα πρέπει να υπάρξει συνεργασία και του γυναικολόγου.

### 1.3 ΑΙΤΙΑ ΑΝΔΡΙΚΗΣ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑΣ

Τα προβλήματα στην ανδρική γονιμότητα μπορεί να προκληθούν από διάφορα ζητήματα υγείας και ιατρικές θεραπείες εκ των οποίων κάποια είναι:

#### **Κιρσοκήλη**

Δημιουργείται από διογκωμένες φλέβες πάνω από τους όρχεις και μπορεί να γίνεται αντιληπτή με το μάτι ή με την ψηλάφηση. Ωστόσο, η έγκυρη διάγνωσή της απαιτεί τη χρήση έγχρωμου υπερηχογραφήματος του οσχέου, όπου θα καταμετρηθεί το εύρος των φλεβών και θα διαπιστωθεί η παλινδρόμηση του φλεβικού αίματος. Στις περισσότερες των περιπτώσεων, εντοπίζεται μόνο στον αριστερό όρχι, αλλά μπορεί να είναι και αμφοτερόπλευρη. Η κιρσοκήλη παρατηρείται περίπου στο 20% όλων των αντρών και είναι αιτία για το 40% των υπογόνιμων αντρών, επηρεάζοντας την ποιότητα του σπέρματος ποικιλοτρόπως. Μειώνει τη συγκέντρωση και τον συνολικό αριθμό των σπερματοζωαρίων, περιορίζει σημαντικά την κινητικότητά τους, επηρεάζει αρνητικά τη μορφολογία τους και αυξάνει το ποσοστό βλαβών στο DNA του σπερματοζωαρίου. Η κιρσοκήλη αντιμετωπίζεται χειρουργικά, και η καταλληλότερη χειρουργική επέμβαση είναι η μικροχειρουργική διατομή των διογκωμένων φλεβών του όρχεως, που δημιουργούν το πρόβλημα. Η έγκαιρη αντιμετώπιση της κιρσοκήλης μπορεί να βελτιώσει τις παραπάνω παραμέτρους του σπέρματος. Ωστόσο, όταν η κιρσοκήλη προκαλέσει σοβαρή μείωση του αριθμού των σπερματοζωαρίων (κάτω των 5 εκατομμυρίων ανά ml), τότε η διόρθωση της κιρσοκήλης θα έχει μικρή επιτυχία στον επανέλεγχο της γονιμότητας του άντρα.

#### **Γενετικές ανωμαλίες**

Οι κυριότερες είναι μεταλλάξεις στο γονίδιο της κυστικής ίνωσης, που οδηγούν σε αγενεσία του σπερματικού πόρου, χρωμοσωμικές ανωμαλίες που ευθύνονται για διάφορα σύνδρομα, όπως εκείνο του Klinefelter, και μικροελλείψεις στο χρωμόσωμα Y, που μπορούν να οδηγήσουν από μικρή μείωση του αριθμού των σπερματοζωαρίων μέχρι και αζωοσπερμία.

#### **Ορμονικές διαταραχές**

Μπορεί να οφείλονται σε διαταραχή της λειτουργίας του θυρεοειδούς, σε ανεπάρκεια κάποιων ορμονών ή σε ανωμαλία στη δράση κάποιων ορμονών, σε κάποια συγγενή σύνδρομα κ.ά..

Βασικές ορμόνες που ελέγχουν ή επηρεάζουν τη σπερματογένεση είναι η FSH, η LH, η τεστοστερόνη, η προλακτίνη, η TSH και η ανασταλτίνη B (inhibin B). Σε ορισμένες περιπτώσεις, η αντιμετώπιση των ανωμαλιών αυτών μπορεί να επαναφέρει τη γονιμότητα του άντρα.



### **Δομικές ανωμαλίες**

Δομικές ανωμαλίες του πέους, όπως επισπαδίας, υποσπαδίας και φίμωση, μπορούν να επηρεάσουν τη σωστή εναπόθεση του σπέρματος στον κόλπο της γυναίκας. Η χειρουργική αντιμετώπιση αυτών των ανωμαλιών συνήθως λύνει το πρόβλημα της υπογονιμότητας.

### **Φλεγμονές**

Προστατίτιδα, επιδιδυμίτιδα, ορχίτιδα κ.ά., που κατά περίπτωση μπορεί να οφείλονται σε λοιμώξεις από παρωτίτιδα, γονόρροια, μυκόπλασμα-ουρεόπλασμα, χλαμύδια, φυματίωση κ.ά. μπορούν να επηρεάσουν την ποιότητα του σπέρματος. Η αντιμετώπιση των παθήσεων αυτών γίνεται κυρίως με φαρμακευτική αγωγή και είναι συνήθως αποτελεσματική.

### **Άλλες νόσοι**

Ο σακχαρώδης διαβήτης παίζει σημαντικό ρόλο, καθώς επηρεάζει τόσο τη στυτική λειτουργία του πέους όσο και στην ποιότητα της σπερματογένεσης. Δυστυχώς, όταν η βλάβη στη σπερματογένεση ή στη στυτική λειτουργία εδραιωθεί, τότε η κατάσταση αυτή δεν μπορεί πλέον να αναστραφεί. Γι' αυτόν τον λόγο η σωστή και αυστηρή ρύθμιση του σακχάρου είναι απαραίτητη. Η στυτική δυσλειτουργία σε πολλές περιπτώσεις αντιμετωπίζεται φαρμακευτικά, ενώ, εάν υπάρχει βλάβη στη σπερματογένεση, τότε απαιτείται εξωσωματική γονιμοποίηση.

Η χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, επίσης, αποτελεί μία σημαντική αιτία υπογονιμότητας στον άντρα. Η μόνη λύση στους άντρες αυτούς είναι η μεταμόσχευση νεφρού ή, όταν η λύση αυτή αργεί ή δεν είναι εφικτή, το ζευγάρι πρέπει να καταφύγει στην υποβοηθούμενη σύλληψη (εξωσωματική γονιμοποίηση).

### **Προβλήματα με την εκσπερμάτιση**

Η παλίνδρομη εκσπερμάτιση συμβαίνει όταν το προϊόν της εκσπερμάτισης εισέρχεται στην ουροδόχο κύστη κατά τον οργασμό, αντί να εξέρχεται από την κορυφή του πέους. Διάφορα προβλήματα υγείας μπορούν να προκαλέσουν την παλίνδρομη εκσπερμάτιση, συμπεριλαμβανομένων του διαβήτη, των τραυματισμών της σπονδυλικής στήλης, της λήψης φαρμάκων και του χειρουργείου στην ουροδόχο κύστη, τον προστάτη, ή την ουρήθρα. Κάποιοι άνδρες με τραυματισμούς στη σπονδυλική στήλη, ή συγκεκριμένα νοσήματα δεν εκσπερματίζουν, αν και παράγουν φυσιολογικά σπερματοζώαρια.

### **Όγκοι**

Τόσο οι καρκινικοί, όσο και οι καλοήθεις όγκοι μπορεί να προσβάλουν τα ανδρικά αναπαραγωγικά όργανα απευθείας, ή να επηρεάσουν τους αδένες, όπως είναι η υπόφυση που απελευθερώνουν ορμόνες απαραίτητες για την αναπαραγωγή. Σε κάποιες περιπτώσεις το χειρουργείο, η ακτινοβολία, ή η χημειοθεραπεία που διεξάγονται για την αντιμετώπιση του όγκου, βάζουν την ανδρική γονιμότητα.



## **ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΑΙΤΙΕΣ**

Η υπερέκθεση σε συγκεκριμένα περιβαλλοντικά στοιχεία που περιλαμβάνουν υψηλή θερμοκρασία, τοξίνες και χημικές ουσίες μπορεί να μειώσουν την παραγωγή και τη λειτουργία των σπερματοζωαρίων. Οι συγκεκριμένες περιβαλλοντικές αιτίες της υπογονιμότητας περιλαμβάνουν:

### **Βιομηχανικά χημικά**

Η εκτεταμένη έκθεση σε ουσίες όπως είναι το βενζένιο, το ξυλένιο, το τολουένιο, τα παρασιτοκτόνα, τα ζιζανιοκτόνα, οι οργανικοί διαλύτες, τα υλικά βαφής και το μόλυβδο μπορεί να συμβάλλει στο μειωμένο αριθμό σπερματοζωαρίων. Η έκθεση σε βαρέα μέταλλα: Η έκθεση στο μόλυβδο, ή σε άλλα βαρέα μέταλλα μπορεί επίσης να προκαλέσει υπογονιμότητα.

### **Ακτινοβολία**

Η έκθεση σε ακτινοβολία μπορεί να μειώσει την παραγωγή σπέρματος αν και συχνά επανέρχεται σε φυσιολογικά επίπεδα. Σε υψηλές δόσεις ακτινοβολίας ωστόσο, η παραγωγή σπερματοζωαρίων μπορεί να υποστεί μια μόνιμη μείωση.

### **Η υπερθέρμανση των όρχεων**

Η συχνή χρήση της σάουνας, ή τα ζεστά μπάνια, μπορεί να μειώσουν παροδικά τον αριθμό των σπερματοζωαρίων. Η υιοθέτηση της καθιστής στάσης για μεγάλα χρονικά διαστήματα, η επιλογή στενών ενδυμάτων, ή η εργασία με laptop για πολύ ώρα, μπορεί να αυξήσουν τη θερμοκρασία στο όσχεο και να μειώσουν ελαφρώς την παραγωγή σπερματοζωαρίων.

Κάποιοι άλλοι αιτιολογικοί παράγοντες της ανδρικής υπογονιμότητας περιλαμβάνουν:

### **Στεροειδή**

Η λήψη των αναβολικών στεροειδών για τη διέγερση της μυϊκής δύναμης και ανάπτυξης μπορεί να προκαλέσουν συρρίκνωση των όρχεων και μείωση της παραγωγής σπερματοζωαρίων.

### **Κατανάλωση αλκοόλ**

Η κατανάλωση αλκοόλ μπορεί να μειώσει τα επίπεδα τεστοστερόνης, να προκαλέσει στυτική δυσλειτουργία και να μειώσει την παραγωγή σπερματοζωαρίων

### **Επάγγελμα**

Κάποια επαγγέλματα αυξάνουν το κίνδυνο υπογονιμότητας, συμπεριλαμβανομένων αυτών που σχετίζονται με εκτεταμένη χρήση υπολογιστών, εναλλασσόμενο ωράριο κι εργασιακό στρες.

### **Κάπνισμα**

Οι άνδρες που καπνίζουν μπορεί να έχουν μικρότερη συγκέντρωση σπερματοζωαρίων, σε σύγκριση με αυτούς που δεν καπνίζουν. Το παθητικό κάπνισμα μπορεί επίσης να επηρεάσει την ανδρική γονιμότητα.

### **Συναισθηματικό στρες**

Το στρες μπορεί να αλληλεπιδράσει με συγκεκριμένες ορμόνες, απαραίτητες για την παραγωγή σπερματοζωαρίων. Το σοβαρό και παρατεταμένο στρες που συχνά σχετίζεται με την υπογονιμότητα μπορεί να επηρεάσει τον αριθμό των σπερματοζωαρίων.

### **Σωματικό βάρος**

Η παχυσαρκία μπορεί να προκαλέσει ορμονικές αλλαγές με επίπτωση στην ανδρική γονιμότητα.

Όταν το κύριο αίτιο της αντρικής υπογονιμότητας δεν μπορεί να εντοπιστεί (ιδιοπαθής υπογονιμότητα), δεν μπορεί να αντιμετωπιστεί ή αντιμετωπίζεται, αλλά χωρίς ικανοποιητικό αποτέλεσμα, τότε το ζευγάρι απευθύνεται σε εξειδικευμένα κέντρα υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, προκειμένου να εφαρμοστεί κατά περίπτωση κάποια μέθοδος υποβοηθούμενης σύλληψης.

## 2 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΟΥ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ

Ως σπέρμα ονομάζουμε το σύνολο του υγρού που εκβάλλει από την ουρήθρα κατά την εκσπερμάτιση και περιέχει τα σπερματοζωάρια και το σπερματικό υγρό. Το σπερμοδιάγραμμα είναι η πρώτη και ίσως η σημαντικότερη εξέταση της εκτίμησης του σπέρματος του άντρα και κατ επέκταση της γονιμότητας του, κατά την οποία ελέγχονται:

- Τα ποσοτικά χαρακτηριστικά του σπέρματος, όπως pH και ο όγκος σπέρματος (μακροσκοπική εξέταση).
- Τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του σπέρματος, όπως η συγκέντρωση και η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων (μικροσκοπική εξέταση).
- Άλλες παράμετροι, όπως οι συγκολλήσεις σπερματοζωαρίων και η παρουσία λευκών αιμοσφαιρίων.

Για να είναι αξιολογήσιμα τα αποτελέσματα της εξέτασης, θα πρέπει ο άντρας:

- να μην εκσπερμάτισε για τουλάχιστον 2 μέρες, αλλά η αποχή να μην είναι μεγαλύτερη από 7 μέρες
- να μην έχει ιστορικό υψηλού πυρετού ( $>39^{\circ}\text{C}$ ) τους τελευταίους τρεις τουλάχιστον μήνες
- να μην έχει κάνει χρήση φαρμακευτικών ή άλλων ουσιών που μπορεί να βλάψουν το σπέρμα του περιστασιακά.

Σε αυτές τις περιπτώσεις, ο άντρας οφείλει να ενημερώσει τον ιατρό του, προκειμένου να λάβει τις απαραίτητες οδηγίες.

Για αντικειμενική εκτίμηση, θεωρείται απαραίτητος ο έλεγχος δύο ή τριών δειγμάτων σε διάστημα 2-3 συνεχόμενων μηνών, ιδίως εάν ο πρώτος έλεγχος δείξει μειωμένες τιμές σε σχέση με τις φυσιολογικές. Κατά το σπερμοδιάγραμμα, το σπέρμα εξετάζεται μακροσκοπικά, μικροσκοπικά και βιοχημικά.



## 2.1 ΛΗΨΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ

Ο συνολικός όγκος του σπέρματος διαμορφώνεται ως εξής: οι σπερματοδόχοι κύστες εκκρίνουν 2-2,5ml (50-80%), ο προστάτης 0,5ml (15-33%), οι ουρηθραίοι και βολβοουρηθραίοι αδένες 0,1 –0,2ml (3%) ενώ τα σπερματοζωάρια μαζί με τις εκκρίσεις των επιδιδυμίδων και των σπερματικών ληκύθων αποτελούν περίπου το 7% του όγκου του σπέρματος.

Το δείγμα του σπέρματος συλλέγεται διά του αυνανισμού σε δωμάτιο δίπλα στο εργαστήριο, μέσα σε ένα δοχείο μη τοξικό για τα σπερματοζωάρια, πάνω στο οποίο αναγράφεται το ονοματεπώνυμο του εξεταζόμενου και η ώρα παραγωγής του δείγματος. Σε κάθε περίπτωση, το δείγμα του σπέρματος πρέπει να εκτεθεί το λιγότερο δυνατό στις ατμοσφαιρικές συνθήκες. Κατά τη συλλογή, ο άντρας πρέπει να δώσει μεγάλη προσοχή, ώστε να συλλέξει όλη την ποσότητα του σπέρματος. Οι πρώτες σταγόνες περιέχουν το μεγαλύτερο αριθμό των αποβαλλόμενων σπερματοζωαρίων, αλλά οι τελευταίες σταγόνες περιέχουν σημαντικές ουσίες για τη σωστή εκτίμηση άλλων παραμέτρων του σπέρματος, όπως το ιζώδες, η οξύτητα κ.ά.

Σε περίπτωση αδυναμίας λήψης δείγματος στην κλινική, μπορεί ο εξεταζόμενος να το συλλέξει στο σπίτι με αυνανισμό και όχι με σεξουαλική επαφή, ακολουθώντας τις αντίστοιχες οδηγίες. Η μεταφορά του στο εργαστήριο πρέπει να γίνει σε ειδικό αποστειρωμένο δοχείο και μέσα σε είκοσι με τριάντα λεπτά. Κατά τη μεταφορά του, το δείγμα πρέπει να διατηρείται ζεστό (20-37°C).

Υπάρχουν περιπτώσεις, όπως απόφραξη, παλίνδρομη εκσπερμάτιση, όπου δεν είναι δυνατή η λήψη σπέρματος με την μέθοδο του αυνανισμού, όπως περιγράφηκε παραπάνω, προκειμένου να γίνει εκτίμηση του. Σε αυτές τις περιπτώσεις στο σπερμοδιάγραμμα δεν ανευρίσκονται καθόλου σπερματοζωάρια ή δεν υπάρχει καθόλου δείγμα για εξέταση. Επομένως, η μόνη δυνατή λύση γονιμοποίησης είναι εργαστηριακά και για αυτό η λήψη τους γίνεται χειρουργικά (TESE, TESA κ.α).

Ακολουθεί η μακροσκοπική και μικροσκοπική εξέταση του δείγματος που περιγράφεται στα παρακάτω κεφάλαια, με βάση το εγχειρίδιο και τα κριτήρια του WHO (2010).

## 2.2 ΜΑΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ

Αφού ληφθεί το δείγμα δια του αυνανισμού, αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να ρευστοποιηθεί και να είναι δυνατή η αρχική του εκτίμηση. Με τον όρο ρευστοποίηση εννοούμε την σταδιακή μετατροπή του σπέρματος από μια αρχική παχύρρευστη μορφή σε μια τελική ομοιόμορφη και πιο υδαρή μορφή. Η διαδικασία αυτή ολοκληρώνεται συνήθως μέσα σε 30 λεπτά από την στιγμή της λήψης ( μπορεί να ολοκληρωθεί και σε 15 λεπτά). Αν το δείγμα δεν έχει ικανοποιητική ρευστοποίηση στα πρώτα 30 λεπτά, αφήνεται για ακόμη λίγη ώρα, αλλά πάντα στο χρονικό περιθώριο της 1 ώρας, προκειμένου να αποφευχθούν η αφυδάτωση και οι αλλαγές στην θερμοκρασία.

Αφού το δείγμα έχει ρευστοποιηθεί είναι δυνατή η εκτίμηση των φυσικών του χαρακτηριστικών όπως το χρώμα, ο όγκος, το pH και το ιξώδες (Εικόνα 1). Το φυσιολογικό ανθρώπινο σπέρμα έχει χρώμα γκριζωπό έως υποκίτρινο. Σε παθολογικές καταστάσεις παρατηρείται :

- αραιό γαλακτώδες χρώμα, όταν η συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων είναι χαμηλή,
- κοκκινωπό- καφέ χρώμα, όταν υπάρχει πρόσμιξη ερυθροκυττάρων (αιμοσπερμία)
- κίτρινο χρώμα, που υποδηλώνει πιθανή λήψη φαρμάκων, βιταμινών ή ίκτερο.

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, ο κύριος όγκος του δείγματος προέρχεται από τις σπερματοδόχες κύστες και τους προστατικούς αδένες. Είναι σημαντικό να μετρηθεί με ακρίβεια ο όγκος του δείγματος προκειμένου να είναι δυνατή η μέτρηση των σπερματοζωαρίων και τον μη σπερματικών κυττάρων κατά την μικροσκοπική εξέταση. Φυσιολογικά ο όγκος θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 1,5 έως 6 ml. Ο μεγάλος όγκος σπέρματος συνήθως δεν υποκρύπτει τίποτα ιδιαίτερο, αν και μπορεί να συνδέεται με μακρά περίοδο σεξουαλικής αποχής ή ακόμη και φλεγμονή. Παρόλο αυτά οδηγεί σε μεγάλη αραιώση των σπερματοζωαρίων και σε μειωμένη κινητικότητα. Όγκοι < 1,5 ml οδηγούν σε δυσμενή είσοδο των σπερματοζωαρίων στο εσωτερικό της μήτρας μέσω του τραχήλου. Συνήθως οφείλονται σε ανεπαρή συλλογή του δείγματος για αυτό και πρέπει να ρωτάτε ο εξεταζόμενος. Επίσης, ο μικρός όγκος μπορεί να οφείλεται σε λοίμωξη των γεννητικών αδένων, σε απόφραξη και στον υπογοναδισμό.

Το φυσιολογικό pH ενός δείγματος σπέρματος είναι αλκαλικό, καθώς εξαρτάται από τις όξινες εκκρίσεις του προστάτη και τις αλκαλικές εκκρίσεις των σπερματοδόχων κύστεων. Η τιμή του θα πρέπει να είναι ίση ή και μεγαλύτερη από 7,2. Πολύ αλκαλικό pH υποδηλώνει φλεγμονή κυρίως του προστάτη, ενώ πολύ όξινο pH συνδέεται με αγενεσία ή απόφραξη των εκφορητικών πόρων και οδηγεί σε ακινητοποίηση των σπερματοζωαρίων. Η μέτρηση του pH ενός δείγματος είναι



προαιρετική, αλλά αν γίνεται θα πρέπει να πραγματοποιείται πρώτη καθώς η επαφή του δείγματος με το διοξείδιο της ατμόσφαιρας αλλοιώνει τα αποτελέσματα.

Τέλος, εκτιμάται το ιξώδες του δείγματος το οποίο φυσιολογικά θα πρέπει να είναι 0 μετά στα 15-30 (60) λεπτά της ρευστοποίησης. Η εκτίμηση γίνεται με την βοήθεια μιας πιπέτας και την βαρύτητα, καθώς το σπέρμα αναρροφάται και αφήνεται να πέσει μετρώντας την ροή και το μήκος των σταγόνων. Αν οι σταγόνες είναι  $>2\text{cm}$ , έχουν δηλαδή την μορφή νήματος, τότε το δείγμα χαρακτηρίζεται από υψηλό ιξώδες, γεγονός που επηρεάζει τον προσδιορισμό αρκετών παραμέτρων του σπερμοδιαγράμματος σε μικροσκοπικό κυρίως επίπεδο.

## Φυσικοί χαρακτήρες του σπέρματος

1. **pH** ( $> 7,2$ ),
2. **Όψη** (γαλακτώδης),
3. **Χροιά** (τεφρόχροη),
4. **Οσμή** (ιδιάζουσα),
5. **Ιξώδες ή γλοιότητα** (φυσιολογική),
6. **Ρευστοποίηση** (μέσα σε 60 λεπτά),
7. **Όγκος** ( $\geq 2 \text{ mL}$ ),
  - **Υποσπερμία**  $< 2 \text{ ml}$ ,
  - **Υπερσπερμία**  $> 7 \text{ ml}$ ,
  - **Ασπερμία**: Πλήρη απουσία σπέρματος.

9

Εικόνα 1



## 2.3 ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ

Αφού ολοκληρωθεί η μακροσκοπική εξέταση του δείγματος και εφόσον αυτό έχει ρευστοποιηθεί πλήρως, ακολουθείται η μικροσκοπική του εκτίμηση με την βοήθεια μικροσκοπίου αντίθετης φάσης και του Makler Counting Chamber, ένα ειδικά διαμορφωμένο πλακάκι για την μέτρηση του αριθμού των σπερματοζωαρίων και της κινητικότητάς τους (Εικόνα 2).



Εικόνα 2

Συνήθως η μικροσκοπική εξέταση των δειγμάτων γίνεται σε νωπό παρασκεύασμα, που είναι το δείγμα του σπέρματος χωρίς καμία επεξεργασία. Στο νωπό παρασκεύασμα προσδιορίζεται η συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων σε  $10^6$  /ml δείγματος, η κινητικότητα και ο συνολικός αριθμός που υπολογίζεται πολλαπλασιάζοντας τη συγκέντρωση με τον συνολικό όγκο. Επίσης, προσδιορίζεται η παρουσία μικροοργανισμών, η παρουσία επιθηλιακών κυττάρων, η παρουσία συγκολλήσεων ή συσσωρεύσεων και η παρουσία στρογγυλών κυττάρων.

## ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ

Η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων είναι η πρώτη μικροσκοπική παράμετρος που εξετάζεται στο δείγμα αμέσως μετά την ρευστοποίηση του και είναι και η πιο σημαντική, καθώς διακρίνονται τα ακίνητα σπερματοζωάρια που αδυνατούν να γονιμοποιήσουν φυσιολογικά. Σύμφωνα με την τελευταία έκδοση ( 5<sup>η</sup> έκδοση) του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας ( WHO 2010) διακρίνονται οι εξής διαβαθμίσεις στην κίνηση :

- Προωθητική κίνηση (Progressive Motility, PRM) που αφορά τα σπερματοζωάρια που κινούνται ενεργά, είτε ευθύγραμμα είτε σε μεγάλους κύκλους ανεξαρτήτως ταχύτητας,
- Επιτόπια κίνηση (Non-Progressive Motility, NPM) που αφορά οποιοδήποτε άλλο μοτίβο κίνησης, όπως μικροί κύκλοι, κίνηση κεφαλής ή ουράς χωρίς να κινείται το υπόλοιπο σώμα,
- Ακίνησια (Immobility, IM) που χαρακτηρίζει την απουσία κίνησης.

Έτσι, όταν αναφερόμαστε στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων ενός δείγματος εννοούμε είτε την ταχεία προωθητική κίνηση ( PRM ) είτε το σύνολο της ταχείας προωθητικής με την επιτόπια κίνηση ( PRM + NPM ) .

Για την αντικειμενικότερη δυνατή εκτίμηση της κινητικότητας του δείγματος προτείνεται η παρατήρηση διαφορετικών περιοχών, τυχαία επιλεγόμενων σε όλο το εμβαδό της επιφάνειας που βλέπουμε στο μικροσκόπιο. Επίσης θα πρέπει να γίνεται όσο το δυνατό γρηγορότερη καταμέτρηση των σπερματοζωαρίων που φαίνονται σε εκείνη την συγκεκριμένη περιοχή αυτή την δεδομένη χρονική στιγμή, χωρίς να παρατείνεται η παραμονή στο ίδιο οπτικό πεδίο καθώς η εικόνα αλλάζει. Δύο μετρήσεις από διαφορετικές σταγόνες του δείγματος, κάθε μια από τις οποίες περιλαμβάνει τουλάχιστον 200 σπερματοζωάρια από 5 διαφορετικές περιοχές, συγκρίνονται μεταξύ τους. Αν οι διαφορές είναι εντός των αποδεκτών ορίων, υπολογίζονται οι μέσοι όροι των δύο μετρήσεων για κάθε κατηγορία. Σε αντίθετη περίπτωση διαγράφονται και γίνονται εκ νέου δύο μετρήσεις ακολουθώντας την ίδια διαδικασία.

## 2.4 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Η τελική αξιολόγηση ενός δείγματος, ο χαρακτηρισμός του δηλαδή ως φυσιολογικό ή μη, στηρίζεται στην σύγκριση της παραπάνω περιγραφόμενης εκτίμησης του με τιμές αναφοράς καθορισμένες από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (2010). Στον παρακάτω πίνακα δίνονται αυτές οι τιμές :

**Κατώτερα φυσιολογικά όρια  
σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO, 2010)**

Παράμετροι	Κατώτερα φυσιολογικά όρια
Όγκος σπέρματος (ml)	1,5 (1,4-1,7)
Συνολικός αριθμός σπερματοζωαρίων ( $10^6$ / εκσπερμάτιση)	39 (33-46)
Συγκέντρωση σπερματοζωαρίων ( $10^6$ / ml)	15 (12-15)
Συνολική Κινητικότητα (Πρωθητική & Μη πρωθητική κίνηση, %)	40 (38-42)
Πρωθητική κινητικότητα (%)	32 (31-34)
Ζωτικότητα (ζωντανά σπερματοζωάρια, %)	58 (55-63)
Μορφολογία σπερματοζωαρίων (φυσιολογικές μορφές, %)	4 (3,0-4,0)
pH	$\geq 7,2$
Λευκοκύτταρα ( $10^6$ / ml)	<1,0

Πίνακας 1

Εκτιμήσεις δειγμάτων πάνω από τα παραπάνω κατώτερα όρια ή ίδια με αυτά χαρακτηρίζονται ως φυσιολογικά με γονιμοποιητική ικανότητα. Αντίθετα, όταν οι εκτιμήσεις ενός ή περισσότερων παραμέτρων βρίσκονται κάτω από αυτά τα όρια, το δείγμα χαρακτηρίζεται ως παθολογικό και κατατάσσεται σε κατηγορίες ανάλογα την παθολογία του. Τέτοιες περιπτώσεις παθολογικών δειγμάτων είναι :

- ✓ Ολιγοσπερμία : κάτω από το φυσιολογικό όριο η συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων ή ο συνολικός τους αριθμός
- ✓ Ασθενοσπερμία : κατώτερη του φυσιολογικού η πρωθητική κινητικότητα
- ✓ Τερατοζωοσπερμία : το ποσοστό των φυσιολογικών μορφολογικά σπερματοζωαρίων είναι μικρότερο από την τιμή αναφοράς



- ✓ Ολιγοασθενοσπερμία, Ολιγοτερατοζωοσπερμία, ασθενοτερατοζωοσπερμία, ολιγοασθενοτερατοζωοσπερμία : πιθανοί συνδυασμοί των παραπάνω
- ✓ Ασπερμία : απουσία εκσπερμάτισης ( ή παλίνδρομη εκσπερμάτιση)
- ✓ Αζωοσπερμία : απουσία σπερματοζωαρίων από το δείγμα, ακόμη και μετά την φυγοκέντρωση
- ✓ Κρύπτοζωοσπερμία : απουσία σπερματοζωαρίων στο νωπό δείγμα αλλά εμφάνιση μετά την φυγοκέντρωση
- ✓ Νέκροζωοσπερμία : υψηλό ποσοστό ακίνητων σπερματοζωαρίων
- ✓ Νορμοζωοσπερμία : συνολικός αριθμός σπερματοζωαρίων ή η συγκέντρωση τους, το ποσοστό προωθητικής κίνησης και των μορφολογικά φυσιολογικών σπερματοζωαρίων χαμηλότερα των κατώτερων φυσιολογικών ορίων
- ✓ Αίμοσπερμία : παρουσία ερυθρών αιμοσφαιρίων στο δείγμα
- ✓ Λευκοσπερμία : παρουσία  $>10^6$  λευκών αιμοσφαιρίων/ ml .

### 3 ΒΙΤΑΜΙΝΕΣ

Οι Βιταμίνες είναι φυσικές ουσίες (οργανικές ενώσεις μικρού μοριακού βάρους) χωρίς τις οποίες είναι αδύνατη η ζωή. Μία από τις βασικές λειτουργίες των βιταμινών είναι η συμμετοχή τους σε εκείνες τις χημικές αντιδράσεις του οργανισμού που μετατρέπουν τα συστατικά των τροφών (πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, λίπη) σε ενέργεια. Βοηθούν στο μεταβολισμό, την αναπαραγωγή την ανάπτυξη και είναι απαραίτητες για την άμυνα του οργανισμού. Ακόμα και μία πολύ μικρή έλλειψη βιταμινών στον οργανισμό μας, μπορεί να προκαλέσει συμπτώματα ατονίας, εκνευρισμού, υπνηλίας, άγχους, μειωμένης ενεργητικότητας, κακής διάθεσης, ευαισθησία σε κρυολογήματα, έλλειψη συγκέντρωσης, παχυσαρκία. Ο ανθρώπινος οργανισμός δεν μπορεί να τις συνθέσει από μόνος του και έτσι προσλαμβάνει τις απαραίτητες για τη ζωή βιταμίνες, από την τροφή ή τα συμπληρώματα διατροφής.

#### 3.1 ΓΕΝΙΚΑ

Οι βιταμίνες είναι τάξη οργανικών χημικών ενώσεων, οι οποίες είναι απαραίτητες για την κανονική αύξηση και διατήρηση ενός ζωντανού οργανισμού, ο οποίος δεν είναι σε θέση να τις συνθέσει. Οι βιταμίνες ρυθμίζουν τις διάφορες αντιδράσεις του μεταβολισμού ενώ άλλοι μεταβολίτες όπως τα λίπη, οι υδατάνθρακες και οι πρωτεΐνες χρησιμοποιούνται ως πρώτη ύλη αυτών των αντιδράσεων. Έλλειψη μιας βιταμίνης σταματάει τις ειδικές μεταβολικές εργασίες και μπορεί να αλλάξει τη μεταβολική ισορροπία στον οργανισμό. Ανευρίσκονται στην τροφή των οργανισμών, δρουν ακόμη και όταν ανευρίσκονται σε πολύ μικρές ποσότητες, ενώ δεν έχουν θερμιδική αξία.

Σύμφωνα με τη διαλυτότητά τους, οι βιταμίνες χωρίζονται σε λιποδιαλυτές που διαλύονται στα λίπη, και σε υδατοδιαλυτές που διαλύονται στο νερό. Οι λιποδιαλυτές αποθηκεύονται κυρίως στο σπύκι και παραμένουν στο σώμα περίπου 24 ώρες, ενώ αποτελούν συστατικό των βιολογικών μεμβρανών παίζοντας σημαντικό ρόλο στην διατήρηση της λειτουργικότητάς τους. Επίσης, ορισμένες δρουν σε γενετικό επίπεδο ρυθμίζοντας την σύνθεση ορισμένων ενζύμων. Οι υδατοδιαλυτές αποθηκεύονται στο σώμα σε μικρότερες ποσότητες και αποβάλλονται με τον ιδρώτα και τα ούρα. Είναι αυτές που συμμετέχουν στη μεταφορά ενέργειας και στον μεταβολισμό των πρωτεϊνών, των υδατανθράκων και των λιπών.

#### ΥΔΑΤΟΔΙΑΛΥΤΕΣ ΒΙΤΑΜΙΝΕΣ

Οι υδατοδιαλυτές βιταμίνες περιλαμβάνουν τη βιταμίνη C και την ομάδα των βιταμινών B. Είναι απλά μόρια που περιέχουν υδρογόνο, οξυγόνο και άνθρακα ενώ μερικά θείο, άζωτο και κοβάλτιο. Ο βαθμός διάλυσης τους στο νερό είναι διαφορετικός και αυτή η ιδιότητα επηρεάζει την απορρόφηση τους από το έντερο και στη συνέχεια την απέκκριση τους και την αποθήκευσή τους στους ιστούς του οργανισμού. Στην ελεύθερη μορφή τους οι υδατοδιαλυτές βιταμίνες είναι ανενεργές και ενεργοποιούνται όταν συνδεθούν ενζυμικά. Αφού σχηματιστεί ένα ενεργό συνένζυμο πρέπει να συνδεθεί με το κατάλληλο συστατικό πρωτεΐνης έτσι ώστε να μπορέσουν να πραγματοποιηθούν οι διάφορες αντιδράσεις.

Γνωρίζουμε ότι απορροφώνται απ' ευθείας στο αίμα σε υψηλά ποσοστά. Δεν υπάρχει κίνδυνος για τοξικότητα από την υπερβολική πρόσληψη των συγκεκριμένων βιταμινών διότι πλεονάζουσες ποσότητες απομακρύνονται μέσω των ούρων. Έχει διαπιστωθεί ότι καταστρέφονται με το μαγείρεμα, την αποθήκευση και είναι ιδιαίτερα ευαίσθητες στη θερμότητα και στο φως .

### ΛΙΠΟΔΙΑΛΥΤΕΣ ΒΙΤΑΜΙΝΕΣ

Οι λιποδιαλυτές βιταμίνες εξαρτώνται από τα διατροφικά λιπαρά για την απορρόφηση και μεταφορά τους. Κατανέμονται σε 4 ομάδες Α, D , Ε και Κ. Οι βιταμίνες αυτές δεν προσφέρονται όλες από τροφικές πηγές και μερικές δημιουργούνται και συντίθενται από τους οργανισμούς.

Συνδεδεμένες με τα διατροφικά λιπαρά, απορροφώνται στον γαστρεντερικό σωλήνα. Στη συνέχεια κυκλοφορούν μέσω του λεμφικού συστήματος, ενσωματωμένες στις λιποπρωτεΐνες. Η απορρόφησή τους είναι μειωμένη σε τρόφιμα με χαμηλά λιπαρά (όπως το αποβουτυρωμένο γάλα), ακόμα και όταν έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε λιποδιαλυτές βιταμίνες. Οι λιποδιαλυτές βιταμίνες δεν αποβάλλονται από τον οργανισμό, αλλά αποθηκεύονται στο ήπαρ και στους λιπώδεις ιστούς και για τον λόγο αυτό, ο οργανισμός μπορεί να επιβιώσει κάποιο χρονικό διάστημα στην έλλειψή τους. Η ιδιότητα τους αυτή, όμως, μπορεί να ενέχει και κινδύνους όταν αποθηκεύονται σε ποσότητες τοξικές για τον οργανισμό [2,3].

	Πηγές	Συνιστώμενη ημερήσια πρόσληψη
<b>Υδατοδιαλυτές βιταμίνες</b>		
Βιταμίνη C	Ακτινίδιο, πορτοκάλι, γκρέιπφρουτ, μπρόκολο, πράσινες σαλάτες, πράσινη και κόκκινη πιπεριά, ντομάτα, φρούτα	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Μη καπνιστές: 60 mg</li> <li>• Καπνιστές: 100 mg</li> </ul>
Θειαμίνη (B1)	Κρέας, λαχανικά, σιτάρι, μαγιά	1,2 mg
Ριβοφλαβίνη (B2)	Αβγά, γάλα, σκουρόχρωμο πράσινα λαχανικά	1,3 mg
Νιασίνη (B3)	Διημητριακά, σπόροι, σικυτί, όσπρια κρέας	16 mg
Παντοθενικό οξύ (B5)	Κρέας, πουλερικά, ψάρια, διημητριακά, όσπρια	5 mg
Πυριδοξίνη (B6)	Ψάρια, πουλερικά, κρέας, πράσινα φυλλώδη λαχανικά	1,3-1,7 mg
Βιοτίνη (B7)	Κρέας, αβγά, σικυτί, σόγια, ντομάτα, ξηροί καρποί, κουνουπίδι, μανιτάρια, σαρδέλες, σολομός	30 µg
Κυανοκοβαλαμίνη (B12)	Γαλακτοκομικά προϊόντα, αβγά, κρέας	2,4 µg
Φυλλικό οξύ	Πράσινα φυλλώδη λαχανικά, διημητριακά, σικυτί, όσπρια, κρέας	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Άντρες και γυναίκες: 400 µg</li> <li>• Εγκυμοσύνη - θηλασμός: 500-600 µg</li> </ul>
<b>Λιποδιαλυτές βιταμίνες</b>		
Βιταμίνη Α	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ρετινόλη: σικυτί, σαρδάκι, αβγά, γαλακτοκομικά προϊόντα, λιπαρά ψάρια</li> <li>• Καροτενοειδή: πολύχρωμο φρούτα και λαχανικά (καρότα, μπρόκολο, σπανάκι, τομάτες, ροδάκινα, μάνγκο)</li> </ul>	800 mg
Βιταμίνη D	Αβγά, σικυτί, λιπαρά ψάρια, γαλακτοκομικά προϊόντα	<ul style="list-style-type: none"> <li>Δύσκολος ο καθορισμός της συνιστώμενης ημερήσιας πρόσληψης λόγω ενδογενούς παραγωγής.</li> <li>• Ηλικία &gt;65 ετών: 10 µg</li> <li>• Εγκυμοσύνη και θηλασμός: 10 µg</li> <li>• Μεωμένη έκθεση σε ηλιακή ακτινοβολία: 10 µg</li> </ul>
Βιταμίνη Ε	Φυτικά έλαια, ξηροί καρποί, πράσινα φυλλώδη λαχανικά	10 mg
Βιταμίνη Κ	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Κ1: Σκούρα πράσινα φυλλώδη λαχανικά (σπανάκι, μπρόκολο, λάχανο), σπινάκι, ελαιόλαδο</li> <li>• Κ2: Παράγεται από τα βακτήρια του εντέρου</li> </ul>	Δύσκολος ο καθορισμός της συνιστώμενης ημερήσιας πρόσληψης λόγω ενδογενούς παραγωγής

Εικόνα 3

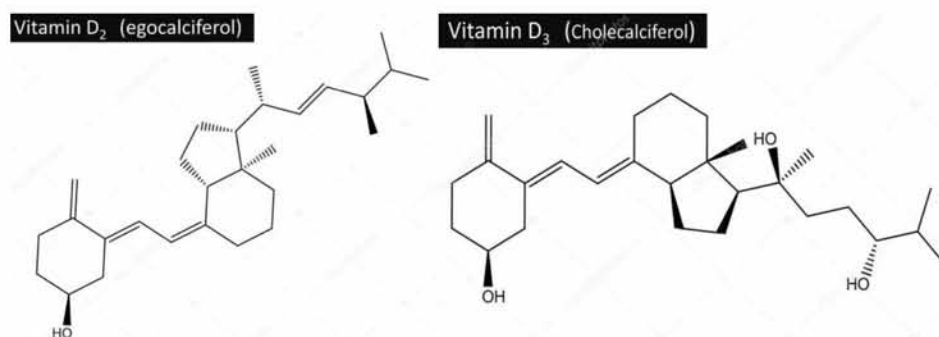


### 3.2 BITAMINΗ D – ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΗΣ

Η εμπειρική ονομασία της είναι χοληκαλσιφερόλη ή αντιραχιτική βιταμίνη. Η βιταμίνη D είναι μια λιποδιαλυτή βιταμίνη η οποία σχηματίζεται στον οργανισμό κυρίως μέσω της απορρόφησης της ηλιακής υπεριώδους ακτινοβολίας από το δέρμα, αλλά και από ορισμένες τροφές πλούσιες στη βιταμίνη. Στην πραγματικότητα όμως δεν πρόκειται για βιταμίνη αλλά για μία προ-στεροειδή ορμόνη, η οποία έχει άμεση δράση στα γονίδια μας. Το τελικό προϊόν του μεταβολισμού της, η καλσιτριόλη (1,25-dihydroxyvitamin D), είναι μια σεκοστεροειδής ορμόνη που αλληλεπιδρά με περισσότερα από 2,500 γονίδια στο ανθρώπινο σώμα.

Η παρουσία της βιταμίνης D είναι απαραίτητη για να μπορούν τα κύτταρα να έχουν πρόσβαση στη «βιβλιοθήκη» του DNA. Στο DNA μας υπάρχουν όλες οι πληροφορίες που χρειάζονται τα κύτταρα μας για να επιβιώσουν, ανάλογα με τις συνθήκες που αντιμετωπίζουν κάθε φορά. Η λειτουργία της διεκπεραιώνεται από υποδοχείς οι οποίοι ρυθμίζουν πάνω 2,500 γονίδια, τα οποία κωδικοποιούν πολλές πρωτεΐνες και παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση, στη διαφοροποίηση και στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Εκτός από τους υποδοχείς οι οποίοι βρίσκονται στο έντερο και στα οστά, έχουν προσδιοριστεί υποδοχείς της βιταμίνης D και στον εγκέφαλο, στον προστάτη, στον μαστό, στο κόλον, σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος καθώς και στους αγγειακούς και καρδιακούς μυς.

Οι δύο μορφές (μεταβολίτες) της βιταμίνης D είναι η εργοκαλσιφερόλη (βιταμίνη D<sub>2</sub>) η οποία περιλαμβάνεται στις τροφές και η χοληκαλσιφερόλη (βιταμίνη D<sub>3</sub>) η οποία παράγεται στο δέρμα μέσω της έκθεσης του από την υπεριώδη ακτινοβολία του ήλιου (Εικόνα 5). Η βιταμίνη D<sub>2</sub> προέρχεται από την εργοστερόλη. Η υπεριώδης ακτινοβολία μετατρέπει την 7-δεϋδροχοληστερόλη σε βιταμίνη D<sub>3</sub> και την εργοστερόλη σε βιταμίνη D<sub>2</sub>. Η βιταμίνη D<sub>3</sub> είναι αρκετά πιο αποτελεσματική στο να αυξάνει τα επίπεδα αίματος 25(OH)D από την D<sub>2</sub>.



Εικόνα 5

Όλες οι λειτουργίες της βιταμίνης D σχετίζονται με την «ορμονική» της δράση. Η κύρια δράση της βιταμίνης D είναι η αύξηση του επιπέδου του ασβεστίου στο αίμα μέσω της προώθησης της απορρόφησης του ασβεστίου και του φωσφόρου από το έντερο, καθώς και μέσω της απελευθέρωσης των μετάλλων αυτών από τα οστά. Προκειμένου να διατηρηθεί η φυσιολογική αναλογία ασβεστίου/φωσφόρου στο σώμα, η βιταμίνη D αυξάνει επίσης την έκκριση φωσφόρου, αλλά όχι ασβεστίου, από τα νεφρά. Επίσης, προλαμβάνει τον ραχιτισμό για αυτό και χαρακτηρίζεται ως αντιραχιτική βιταμίνη, την οστεομαλακία και την κακή οδοντοφυΐα. Τέλος, είναι απαραίτητη για την οστέωση του σκελετού.

Τα επίπεδα βιταμίνης D στον οργανισμό μας μετρώνται με μια αιματολογική εξέταση που λέγεται 25-υδροξύ βιταμίνη D ή 25 (OH) D3

- τιμές 25 (OH) D3 > 30 ng/ml θεωρούνται φυσιολογικές
- τιμές 25 (OH) D3 20-30 ng/ml θεωρούνται ενδεικτικές ανεπάρκειας της βιταμίνης D
- τιμές 25 (OH) D3 < 20 ng/ml θεωρούνται ενδεικτικές έλλειψης της βιταμίνης D [3,4]

## ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ

Η βιταμίνη D3 παράγεται φωτοχημικά από την 7-δεϋδροχοληστερόλη στο δέρμα των περισσότερων σπονδυλωτών ζώων, συμπεριλαμβανομένων των ανθρώπων. Ο πρόδρομος της βιταμίνης D3, 7-δεϋδροχοληστερόλη παράγεται σε σχετικά μεγάλες ποσότητες. Η 7-δεϋδροχοληστερόλη αντιδρά με το φως UVB σε μήκη κύματος μεταξύ 270 και 300 nm, ενώ η σύνθεση κορυφής λαμβάνει χώρα μεταξύ 295 και 297 nm, μήκη κύματος που είναι παρόντα στο φως του ήλιου. Υπό την επίδραση του φωτός, η 7-δεϋδροχοληστερόλη της επιδερμίδας μετατρέπεται σε προβιταμίνη D3, ένα ποσοστό της οποίας ισομερίζεται σε βιταμίνη D3 (χοληκαλσιφερόλη).

Αυτή η βιταμίνη D3 διαχέεται από το δέρμα προς το αίμα με τελικό της στόχο το ήπαρ, όπου μεταβολίζεται από διάφορες υδροξυλάσες προκειμένου να παραχθεί η ενεργή μορφή της βιταμίνης D, με την συμμετοχή και της μορφής της βιταμίνης D3 που προέρχεται από την διατροφή. Η μεταφορά αυτή προς το ήπαρ γίνεται με την βοήθεια μιας α2 σφαιρίνης που συντίθεται επίσης στο ήπαρ, και προσδένει την βιταμίνη D3 (DBP, D-Binding Protein). Αξίζει να σημειωθεί σε αυτό το σημείο, ότι η δερματική παραγωγή της βιταμίνης D3 που θα καταλήξει στην ενεργή μορφή της βιταμίνης D εξαρτάται από το χρώμα του δέρματος, την χρήση αντηλιακού, την ώρα έκθεσης στο ήλιο, το γεωγραφικό πλάτος μιας περιοχής, το υψόμετρο και την ατμοσφαιρική ρύπανση.

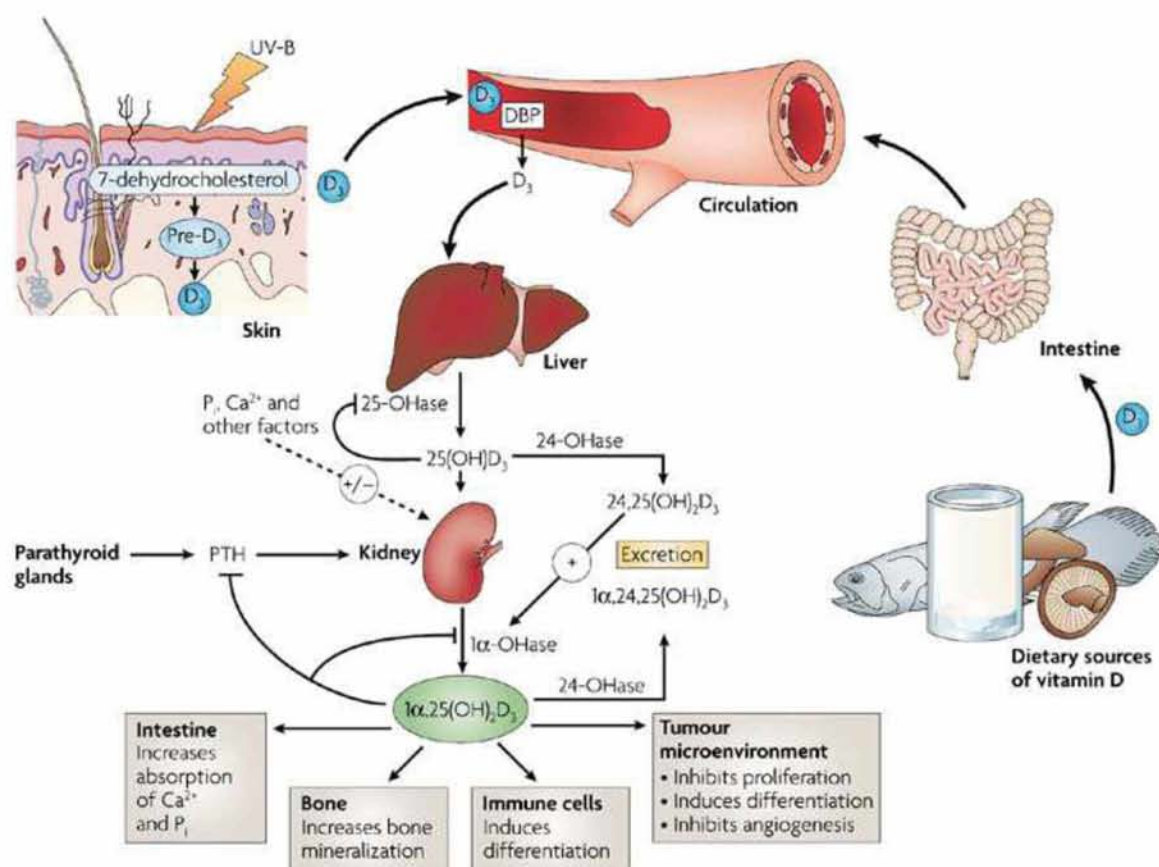
Η βιταμίνη D3, που προέρχεται από την διατροφή μας, απορροφάται μαζί με το διατροφικό λίπος και με την βοήθεια των χολικών αλάτων εισέρχεται με διάχυση στον εντερικό αυλό. Στη συνέχεια ένα μεγάλο ποσοστό είτε με την βοήθεια της DBP είτε των χυλομικρών, καταλήγει στο ήπαρ όπου και υφίσταται την πρώτη υδροξυλίωση της στη θέση 25 από την μιτοχονδριακή 25- υδροξυλάση ( προϊόν του γονιδίου CYP27A1) για να σχηματιστεί η 25- υδροξυχοληκαλσιφερόλη ή καλσιδιόλη ( 25-OH-D3). Μόλις γίνει, το προϊόν απελευθερώνεται στο πλάσμα, όπου δεσμεύεται



με μια πρωτεΐνη φορέα α-σφαιρίνης που ονομάζεται πρωτεΐνη δέσμευσης βιταμίνης D (DBP). Τα επίπεδα της καλσιδιόλης πιστεύεται ότι αντιπροσωπεύουν την κατάσταση της βιταμίνης D3 στο σώμα μας και άρα της βιταμίνης D, για αυτό και είναι αυτή που μετράται όπως αναφέρθηκε παραπάνω.

Η καλσιδιόλη μεταφέρεται στους νεφρούς, όπου υδροξυλιώνεται στη θέση 1-α για να σχηματιστεί η καλσιτριόλη (1,25-διϋδροξυχοληκαλσιφερόλη,  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ). Η μετατροπή της καλσιδιόλης στην καλσιτριόλη καταλύεται από το ένζυμο 25-υδροξυβιταμίνη D3 1-άλφα-υδροξυλάση, το οποίο είναι το προϊόν του ανθρώπινου γονιδίου CYP27B1. Η δραστηριότητα του CYP27B1 αυξάνεται από την παραθυρεοειδή ορμόνη και επίσης από το χαμηλό ασβέστιο.

Μετά το τελικό στάδιο μετατροπής στους νεφρούς, η καλσιτριόλη απελευθερώνεται στην κυκλοφορία. Συνδεδεμένη στην πρωτεΐνη που δεσμεύει τη βιταμίνη D (DBP), η καλσιτριόλη μεταφέρεται σε όλο το σώμα, συμπεριλαμβανομένων των κλασσικών οργάνων-στόχων του εντέρου, των νεφρών και των οστών. Όταν φτάσει στους ιστούς στόχους απελευθερώνεται εύκολα από την DBP και προσδένεται γρήγορα στον υποδοχέα της βιταμίνης D, VDR (Vitamin D Receptor), ο οποίος μεσολαβεί στις περισσότερες από τις φυσιολογικές δράσεις της και αναφέρεται παρακάτω [4,5].



Εικόνα 6



## ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ D – VDR

Ο υποδοχέας της βιταμίνης D (VDR) ανήκει στην υπεροικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων και έχει την λειτουργία μεταγραφικού παράγοντα, ελέγχοντας την κυτταρική αύξηση, την διαφοροποίηση, την ομοιόσταση και ποικίλες άλλες φυσιολογικές διαδικασίες.

Η VDR πρωτεΐνη αποτελείται από τρεις διακριτές περιοχές :

- Την N-τελική περιοχή, όπου προσδένεται το DNA
- Την C-τελική περιοχή, όπου προσδένεται ο προσδέτης
- και μια επιμήκη περιοχή που ενώνει αυτές τις δύο.

Είναι σημαντικό ότι η πληρότητα με  $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$  οδηγεί στο σχηματισμό δύο ανεξάρτητων επιφανειών αλληλεπίδρασης στην πρωτεΐνη VDR, μιας που διευκολύνει την αλληλεπίδραση με ένα άλλο ετεροδιμερές που απαιτείται για την δέσμευση του DNA και μία που είναι απαραίτητη για την στρατολόγηση συρρυθμιστικών συμπλόκων που απαιτούνται για τη γονιδιακή ρύθμιση. Ο VDR μπορεί επίσης να τροποποιηθεί μετα-μεταφραστικά μέσω φωσφορυλίωσης, μια μεταβολή στην πρωτεΐνη η οποία μπορεί να είναι ικανή να ρυθμίζει την μεταγραφική της δραστηριότητα. Αυτές οι περιοχές εντός του VDR δημιουργούν ένα μακρομόριο που είναι δεκτικό στα φυσιολογικά επίπεδα κυκλοφορούντος  $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$ , ικανό να κατευθύνει κυτταρικό ρυθμιστικό μηχανισμό σε συγκεκριμένα υποσύνολα γονιδίων.

Επίσης, ο VDR σχηματίζει ομοδιμερή ή ετεροδιμερή με έναν από τους τρεις υποδοχείς του ρετινοϊκού οξέος (RXR $\alpha$ , RXR $\beta$ , RXR $\gamma$ ). Αυτά τα ομο- ή ετεροδιμερή προσδένονται σε συγκεκριμένους ενισχυτές, που καλούνται στοιχεία απόκρισης της βιταμίνης D (VDRE, VDR response elements) τα οποία βρίσκονται στις περιοχές του υποκινητή ορισμένων γονιδίων στόχων της βιταμίνης [4,5,6].

Τέλος, αξίζει να αναφέρουμε ότι οι κύριοι μηχανισμοί δράσης της καλσιτριόλης ή  $1,25 (\text{OH})_2\text{D}_3$  οδηγούν σε γονιδιακές ή μη αλλαγές. Σε μερικές περιπτώσεις, πιστεύεται ότι λειτουργεί μέσω οδών μεταγωγής σήματος ύστερα από την πρόσδεση της στον μεμβρανικό και στον κυτταροπλασματικό VDR. Αυτοί αλληλεπιδρούν με τα κανάλια SOC (store-operated  $\text{Ca}^{2+}$ ), με αποτέλεσμα σύνδεση της καλσιτριόλης να διεγείρει την εισροή ασβεστίου (μη- γονιδιακός μηχανισμός). Σε άλλες περιπτώσεις, η καλσιτριόλη προάγει γονιδιακές δράσεις, μέσω της αλληλεπίδρασης της με τους πυρηνικούς υποδοχείς VDR που έχουν σχηματίσει ομο- ή ετεροδιμερή, επηρεάζοντας έτσι την μεταγραφή γονιδίων. Η δραστηριότητα αυτή απαιτεί και την συμβολή συρρυθμιστών, που δρουν είτε διεγερτικά είτε κατασταλτικά [4,5].

### 3.3 ΒΙΤΑΜΙΝΗ D ΚΑΙ ΣΠΕΡΜΑ

Ο υποδοχέας βιταμίνης D (VDR) και τα ένζυμα που μεταβολίζουν τη βιταμίνη D (VD) εκφράζονται στον ανθρώπινο εκσπερμάτικο πόρο, στα γεννητικά κύτταρα και στα ώριμα σπερματοζωάρια [46]. Ο VDR και όλα τα ένζυμα μεταβολισμού της VD συν-εκφράζονται κατά τα τελευταία στάδια της σπερματογένεσης στον αυχένα των ώριμων σπερματοζωαρίων [46,47]. Κατά συνέπεια, η βέλτιστη λειτουργία του σπέρματος μπορεί να εξαρτάται από την άμεση επίδραση της VD. Ωστόσο, θα μπορούσε επίσης να επηρεαστεί έμμεσα μέσω της ομοιοστάσης του ασβεστίου, καθώς η μειωμένη γονιμότητα σε ζωικά μοντέλα αποκαταστάθηκε εν μέρει μόνο με την ομαλοποίηση των επιπέδων ασβεστίου στον ορό [48]. Η VD έχει εκτεταμένες βιολογικές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένου ενός ουσιαστικού ρόλου για τη συστηματική ομοιοστασία του ασβεστίου [49] και ένας ρόλος για το ασβέστιο στην ωρίμανση των ανθρώπινων σπερματοζωαρίων είναι καλά τεκμηριωμένος και επισημαίνεται με την 2-3 φορές υψηλότερη συγκέντρωση ασβεστίου στο ανθρώπινο επιδιδυμικό και προσθετικό υγρό σε σύγκριση με τον ορό.

Η επαγόμενη από το VD αύξηση του ασβεστίου στα σπερματοζωάρια του ανθρώπου υποδηλώνει ότι η VD μπορεί να εμπλέκεται στην επαγωγή της κινητικότητας [50]. Η 1,25 (OH) 2D3 ήταν ικανή να προκαλέσει μέτρια αύξηση της κινητικότητας του σπέρματος, η οποία είναι σύμφωνη με προηγούμενη μελέτη που έδειξε ότι η VD αύξησε το ασβέστιο σε προϊόντα λύσης σπέρματος, την κινητικότητα και την δραστηριότητα της ακροσίνης [51]. Ανακαλύψαμε ότι η 1,25 (OH) 2D3 προκάλεσε σημαντικά υψηλότερη αναλογία κινητικών σπερματοζωαρίων για να υποβληθούν στην ακροσωμική αντίδραση που ήταν ενεργοποιημένα, που μπορεί να προκληθεί από την αύξηση του ασβεστίου από το λαιμό στην κεφαλή των σπερματοζωαρίων.

Συμπερασματικά, δείχνουμε ότι η θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων VD του ορού και της κινητικότητας του σπέρματος υποστηρίζεται από νέα λειτουργικά ευρήματα, τα οποία υποδηλώνουν ότι η VD μπορεί να συνεισφέρει στην βέλτιστη λειτουργία του σπέρματος. Ο VDR και τα ένζυμα μεταβολισμού της VD εκφράζονται σε ώριμα σπερματοζωάρια και *in vitro* πειράματα αποκάλυψαν ότι η VD μέσω μη-γονιδιωματικής ενεργοποίησης του VDR αύξησε το ενδοκυτταρικό ασβέστιο από ενδοκυτταρικές αποθήκες ασβεστίου στον αυχένα ανθρώπινων σπερματοζωαρίων, την κινητικότητα σπέρματος και την ακροσωμική αντίδραση [46].



## 4 ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ

Η διαδικασία η οποία καθιστά δυνατή τη διατήρηση των κυττάρων σε κρυογονικές θερμοκρασίες, ονομάζεται κρυοσυντήρηση και αποτελεί πλέον ένα αναπόσπαστο κομμάτι των τεχνικών της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Πληθώρα πλεονεκτημάτων από την εφαρμογή της τεχνολογίας της κρυοσυντήρησης, έχουν οδηγήσει στην ανάπτυξη μεθόδων οι οποίες επιτρέπουν τη συντήρηση μιας ποικιλίας κυτταρικών τύπων, συμπεριλαμβανομένων των αρσενικών και των θηλυκών γαμετών αλλά και πολυκύτταρων οργανισμών όπως τα έμβρυα, σε ιδιαίτερα χαμηλές θερμοκρασίες, με σκοπό την χρήση τους σε μεταγενέστερη χρονική στιγμή.

Η κρυοσυντήρηση διατηρεί τα κύτταρα και τους ιστούς σε ιδιαίτερα χαμηλές θερμοκρασίες, μεταξύ  $-140^{\circ}\text{C}$  και  $-200^{\circ}\text{C}$ . Συνήθως, πλέον η θερμοκρασία που έχει παγιωθεί για την κρυοσυντήρηση είναι οι  $-196^{\circ}\text{C}$ . Στη θερμοκρασία των  $-196^{\circ}\text{C}$ , ο μεταβολισμός διακόπτεται σχεδόν απολύτως, με αποτέλεσμα οι αλλοιώσεις να είναι μηδαμινές. Τέτοιες θερμοκρασίες είναι αδύνατον να επιτευχθούν με οποιουδήποτε τύπου ηλεκτρικό ψυγείο, υπερκαταψύκτες κ.λπ. Ωστόσο, είναι γνωστό ότι τα αέρια, σε υγροποιημένη μορφή, βρίσκονται από μόνα τους σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες. Το αέριο που χρησιμοποιείται ευρύτατα στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή, αλλά και σε άλλες βιολογικές και ιατρικές εφαρμογές, είναι το υγρό άζωτο ( $\text{N}_2$ ). Το άζωτο είναι αδρανές μόριο (δεν προκαλεί χημικές αντιδράσεις) και επομένως δεν βλάπτει τα βιολογικά δείγματα.

Κατά την διαδικασία της κατάψυξης συμβαίνουν μια σειρά από γεγονότα: αρχικά δημιουργούνται κρύσταλλοι στον εξωκυττάριο χώρο. Όλες οι διαλυμένες ουσίες που υπάρχουν στο διάλυμα αναγκάζονται έτσι να συγκεντρωθούν στον όσο διαθέσιμο χώρο δημιουργείται από το νερό που δεν έχει μετατραπεί σε κρυστάλλους. Καθώς η θερμοκρασία ελαττώνεται, ο διαθέσιμος αυτός χώρος λιγοστεύει ακόμη περισσότερο και εκεί φυσικά η συγκέντρωση των διαλυμένων ουσιών αυξάνεται. Στον ίδιο όμως χώρο βρίσκονται και τα κύτταρα, που έτσι βρίσκονται εκτεθειμένα σε υπερτονικό διάλυμα. Λόγω των οσμωτικών φαινομένων λοιπόν, το νερό που υπάρχει στο εσωτερικό των κυττάρων αναγκάζεται να μεταφερθεί στον εξωκυττάριο χώρο.

Ο ρυθμός της κατάψυξης καθορίζει αν όλη η ποσότητα του νερού που βρίσκεται μέσα στο κύτταρο θα μετακινηθεί ή αν κάποια ποσότητα θα παραμείνει στο εσωτερικό του κυττάρου. Στην περίπτωση που έστω και μικρή ποσότητα νερού παραμείνει στο εσωτερικό του κυττάρου τότε στις χαμηλές θερμοκρασίες της κρυοσυντήρησης θα δημιουργηθούν ενδοκυτταρικά κρύσταλλοι, που θα οδηγήσουν στην καταστροφή του κυττάρου. Προκειμένου να αποφευχθεί η δημιουργία κρυστάλλων στο εσωτερικό των κυττάρων που καταψύχονται χρησιμοποιούνται πλέον κρυοπροστατευτικά μέσα και συγκεκριμένος ρυθμός κατάψυξης βάση πρωτοκόλλου, τα οποία θα περιγραφούν παρακάτω [8].



## 4.1 ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ

Η κρυοσυντήρηση των ανθρώπινων σπερματοζωαρίων αποτελεί σήμερα ένα αναπόσπαστο τμήμα της Ιατρικώς Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής (ΙΥΑ). Ως κρυοσυντήρηση ορίζεται η διαδικασία κατά την οποία τα κύτταρα σταθεροποιούνται σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες. Η μεθοδολογία, οι εργαστηριακές τεχνικές κατάψυξης, το είδος και η συγκέντρωση του κρυοπροστατευτικού υλικού, ο ρυθμός ψύξης και απόψυξης, καθώς επίσης και οι αμπούλες που χρησιμοποιούνται, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο βαθμό αποτελεσματικότητας της διαδικασίας.

Το σπέρμα μπορεί να παραμείνει σε κρυοσυντήρηση θεωρητικά επ' αόριστον. Κατάψυξη σπέρματος προτείνεται συνήθως:

- Σε περίπτωση κινδύνου απώλειας της αναπαραγωγικής ικανότητας στον άνδρα (όπως περιπτώσεις αφαίρεσης όρχεων για θεραπευτικούς σκοπούς, προγραμματιζόμενης χημειοθεραπείας, ακτινοθεραπείας κ.λπ.).
- Σε περίπτωση απουσίας του συζύγου την ημέρα της ωοληψίας ή της σπερματέγχυσης, για επαγγελματικούς λόγους (π.χ. ναυτικά ή στρατιωτικά επαγγέλματα).
- Σε χειρουργική λήψη σπέρματος, όταν υπάρχει περίσσεια, ώστε να αποφευχθεί νέα βιοψία σε πιθανή επόμενη προσπάθεια.
- Σε δυσκολία σπερμοληψίας για ψυχολογικούς λόγους.
- Σε προοδευτική πτώση των παραμέτρων του σπέρματος (ολιγοζωοσπερμία, άσθενοσπερμία)
- Σε επιθυμητή στειροποίηση άνδρα με απολίνωση του σπερματικού πόρου.

### ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΤΑΨΥΞΗΣ

Δύο είναι οι βασικές τεχνικές κατάψυξης που εφαρμόζονται : η αργή και η ταχεία που περιγράφονται παρακάτω, καθώς επίσης και μια Τρίτη που χρησιμοποιείται ευρέως τα τελευταία χρόνια.

#### 1. ΑΡΓΗ

Η τεχνική της αργής κατάψυξης σπερματοζωαρίων συνίσταται στην προοδευτική ψύξη των κυττάρων εντός 2-4 ωρών σε 2 ή 3 βήματα με χρήση μη αυτοματοποιημένου ή αυτοματοποιημένου καταψύκτη. Η μη αυτοματοποιημένη μέθοδος περιλαμβάνει τη μείωση της θερμοκρασίας του σπέρματος με ταυτόχρονη σταδιακή προσθήκη κρυοπροστατευτικού υλικού βήμα βήμα και ακολούθως βύθιση σε υγρό άζωτο.

Η ανάγκη για επίτευξη μεγαλύτερης επαναληψιμότητας της διαδικασίας συνέτεινε στην διερεύνηση της χρήσης αυτοματοποιημένων

πρωτοκόλλων. Η τεχνική περιλαμβάνει τη χρήση ειδικής συσκευής (καταψύκτη) με υποδοχή για τις αμπούλες του σπέρματος. Η ψύξη επιτυγχάνεται με τη βοήθεια ατμών υγρού αζώτου που τοποθετείται σε μια δεξαμενή κάτω από την υποδοχή των αμπουλών. Ο ρυθμός ψύξης είναι συγκεκριμένος και μετά την ολοκλήρωση του, οι αμπούλες τοποθετούνται στους  $-196^{\circ}\text{C}$  εντός υγρού αζώτου. Η διάρκεια της διαδικασίας είναι περίπου 40 min. Τα πλεονεκτήματα του αυτοματοποιημένου πρωτοκόλλου είναι η απλότητα στη χρήση, το γεγονός ότι δεν απαιτεί τη συνεχή παρέμβαση του χειριστή και η αυξημένη επαναληψιμότητα.

## 2. TAXEIA

Η μέθοδος, απαιτεί άμεση επαφή των αμπουλών του σπέρματος με τους ατμούς του υγρού αζώτου για 8-10 min με επακόλουθη βύθιση σε υγρό άζωτο στους  $-196^{\circ}\text{C}$ . Σύμφωνα με το εργαστηριακό πρωτόκολλο, το δείγμα αναμιγνύεται αρχικά με μορφή σταγόνας με ίσο όγκο κρυοπροστατευτικού υλικού σε. Το μείγμα φορτώνεται στις αμπούλες και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min. Οι αμπούλες στη συνέχεια τοποθετούνται σε απόσταση 15-20 cm πάνω από το επίπεδο του υγρού αζώτου ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) για 15 min. Κατόπιν βυθίζονται στο υγρό άζωτο. Κατά τη διάρκεια της ψύξης, είναι προτιμότερο τα δείγματα να τοποθετούνται σε οριζόντια θέση, για να ελαχιστοποιηθεί η θερμοκρασιακή διαφορά μεταξύ των δύο άκρων [8,9].

## 3. ΥΑΛΟΠΟΙΗΣΗ (VITRIFICATION)

Η υαλοποίηση είναι μια σύγχρονη τεχνική κατάψυξης, η οποία εφαρμόστηκε αρχικώς σε ωάρια και έμβρυα, με εξαιρετικά αποτελέσματα σε σχέση με παλαιότερες μεθόδους. Η εφαρμογή της προτάθηκε επίσης και στο σπέρμα ως εναλλακτική των συμβατικών μεθόδων. Η τεχνική περιλαμβάνει μικρής ποσότητας σπέρματος ανά αμπούλα, με χρήση ή μη κρυοπροστατευτικού υλικού. Πρόκειται για μια μέθοδο ταχείας κατάψυξης, κατά την οποία τα κύτταρα παγώνουν με απ' ευθείας βύθιση σε υγρό άζωτο. Στην περίπτωση κατά την οποία προστίθεται κρυοπροστατευτικό υλικό, προηγείται αφυδάτωση. Εναλλακτικά, όταν δεν χρησιμοποιείται κρυοπροστατευτικό υλικό, πραγματοποιείται ταχεία ψύξη σταγόνων μικρού όγκου (20  $\mu\text{l}$ ) σπέρματος άμεσα. Κατά τη διαδικασία της υαλοποίησης, ο ρυθμός ψύξης είναι υψηλός, ενώ ο όγκος του δείγματος και του κρυοπροστατευτικού υλικού είναι χαμηλός.

Τα κατεψυγμένα δείγματα μπορούν να κρυοσυντηρηθούν ακόμα και στους  $-80^{\circ}\text{C}$ , χωρίς τη χρήση υγρού αζώτου, πράγμα που μειώνει το κόστος κρυοσυντήρησης. Η μέθοδος είναι σχετικά απλή, οικονομική και αποδοτική σε ό,τι αφορά στην επανάκτηση ζώντων σπερματοζωαρίων με λιγότερες βλάβες στο DNA [8].

Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της υαλοποίησης για τα δείγματα σπέρματος που συλλέχθηκαν.



## ΡΥΘΜΟΣ ΚΑΤΑΨΥΞΗΣ

Όπως αναφέρθηκε, κατά την διαδικασία της κατάψυξης – απόψυξης ο βαθμός της αποτελεσματικότητας της είναι ο σημαντικότερος στόχος. Οι αλλαγές που προκαλούνται επηρεάζουν όχι μόνο την βιωσιμότητα των σπερματοζωαρίων αλλά και την κινητικότητα ή τους μοριακούς μηχανισμούς που είναι απαραίτητοι για την είσοδό τους στο ωάριο. Στην περίπτωση που η κινητικότητα μετά την απόψυξη είναι περίπου στο 50% της αρχικής τότε κατάψυξη θεωρείται πολύ ικανοποιητική.

Οι αλλαγές που συμβαίνουν στην κινητικότητα οφείλονται στις αλλοιώσεις που προκαλεί η πτώση της θερμοκρασίας, ακόμη και όταν γίνεται βαθμιαία και με χαμηλό ρυθμό, στην μεμβράνη. Όπως έχουν δείξει μελέτες, οι δύο στιβάδες των φωσφολιπιδίων της μεμβράνης απομακρύνονται η μία από την άλλη χωρίς να μπορούν να επανέλθουν τελείως στην αρχική τους θέση μετά την απόψυξη. Βέβαια, αλλαγές συμβαίνουν επίσης και στις πρωτεΐνες που εντοπίζονται στη διπλοστιβάδα. Η απομάκρυνση των στιβάδων έχει σαν αποτέλεσμα οι πρωτεΐνες να συσσωρεύονται και να προκαλείται αλλαγή στην λειτουργικότητά τους, ειδικά αν λειτουργούν ως κανάλια ιόντων.

Για το λόγο αυτό, η μεταβολή της θερμοκρασίας από τη θερμοκρασία περιβάλλοντος στους  $-196^{\circ}\text{C}$ , θα πρέπει να γίνεται με συγκεκριμένο ρυθμό. Ένας ταχύς ρυθμός κατάψυξης προκαλεί σχηματισμό ενδοκυτταρικού πάγου λόγω μη εξόδου του νερού από την κυτταρική μεμβράνη, πράγμα που συνεπάγεται υπέρψυξη και επακόλουθη μείωση της κυτταρικής επιβίωσης. Αντίθετα, ένας πολύ αργός ρυθμός κατάψυξης δημιουργεί αυξημένη συγκέντρωση διαλυτών στοιχείων εντός του κυττάρου (λόγω αυξημένης εξόδου νερού) και οσμωτικής πίεσης. Το γεγονός αυτό προκαλεί μεταβολές του κυτταρικού όγκου, αφυδάτωση και τοξικές επιδράσεις. Επομένως, για την επιτυχή διατήρηση των κυττάρων, η ταχύτητα με την οποία ελαττώνεται η θερμοκρασία δεν πρέπει να είναι ούτε υψηλή, ούτε χαμηλή, και για κάθε κατηγορία κυττάρων υπάρχει ένας ιδανικός ρυθμός ψύξης. Ο ιδανικός αυτός ρυθμός δεν πρέπει να προκαλεί μη αναστρέψιμη μεταβολή στην κυτταρική μεμβράνη [8,10].



## 4.2 ΑΠΟΨΥΞΗ

Η απόψυξη αποτελεί ένα εξίσου σημαντικό βήμα, κατά το οποίο το κύτταρο πρέπει να έχει το χρόνο να ανακτήσει τις φυσιολογικές του βιολογικές λειτουργίες, αποφεύγοντας κατά το δυνατόν τις απότομες θερμοκρασιακές αλλαγές. Σε γενικές γραμμές, τα πρωτόκολλα απόψυξης χρησιμοποιούν τη θερμοκρασία των 37ο C. Μεγαλύτερες θερμοκρασίες, αν και επιτρέπουν την ταχύτερη απόψυξη, δεν χρησιμοποιούνται γιατί αυξάνουν τον κίνδυνο κυτταρικής βλάβης. Οι συνηθέστερα εφαρμοζόμενες μέθοδοι απόψυξης είναι:

- Απόψυξη σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min και επακόλουθη τοποθέτηση σε κλίβανο 37° C για 10 min
- Απόψυξη σε κλίβανο και υδατόλουτρο 37° C για 10 min
- Απόψυξη σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min

Μετά την απόψυξη, το σπέρμα πρέπει να διαχωρίζεται από το κρυοπροστατευτικό υλικό μέσω καθαρισμού ή έκπλυσης σε καλλιεργητικό υλικό μέσω φυγοκέντρησης<sup>9</sup>. Βλαβερές συνέπειες μπορούν επίσης να προκληθούν και κατά την απόψυξη, όπου ο πάγος λιώνει και ανακρυσταλώνεται. Το φαινόμενο αυτό σημειώνεται ενδο- και εξω-κυτταρικά με τη μορφή θερμοδυναμικά ασταθών κρυστάλλων μικρού μεγέθους που ανασυντίθεται όσο αυξάνει η θερμοκρασία. Η επίδραση του ρυθμού απόψυξης επηρεάζει με διαφορετικό τρόπο τα διάφορα είδη κυττάρων. Πρόσφατες έρευνες υποστηρίζουν ότι σε κατάψυξη ταχέως ρυθμού, π.χ. υαλοποίηση ή λυοφιλίωση, η βλάβη των σπερματοζωαρίων αποδίδεται σε μια οσμωτική ανισορροπία κατά την απόψυξη και όχι στη δημιουργία ενδοκυτταρικού πάγου.

### 4.3 ΚΡΥΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΑ

Η επιτυχία της κρυοσυντήρησης σπέρματος, εξαρτάται από τη διατήρηση της δομικής και λειτουργικής ακεραιότητας του κυττάρου. Ωστόσο, για τη διατήρηση της λειτουργικής ακεραιότητας, απαραίτητη είναι η προστασία της διαμερισματοποίησης του κυττάρου, έτσι ώστε μετά την απόψυξη το κύτταρο να διαθέτει τη γονιμοποιητική του ικανότητα στο υψηλότερο εφικτό ποσοστό. Η πρόκληση λοιπόν για τα κύτταρα δεν είναι να διατηρηθούν σε βιώσιμη κατάσταση στις χαμηλές θερμοκρασίες, αλλά να αντέξουν την αλλαγή της θερμοκρασίας κατά την ψύξη και την απόψυξη.

Ο στόχος αυτός επιτυγχάνεται με τη χρήση κρυοπροστατευτικών ουσιών, και την τήρηση συγκεκριμένου πρωτοκόλλου όσον αφορά στον ρυθμό προσθήκης της κρυοπροστατευτικής ουσίας. Τα κρυοπροστατευτικά (cryoprotectants, CPA), είναι χημικές ουσίες, μικρού ή μεγάλου μοριακού βάρους, οι οποίες διαλύονται στο νερό, χαμηλώνουν το σημείο τήξεως του διαλύματος και παρέχουν στα κύτταρα προστασία που οφείλεται στην αλλαγή που προκαλούν στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του διαλύματος στο οποίο βρίσκονται. Χωρίς την παρουσία του κρυοπροστατευτικού, και με υψηλούς ρυθμούς κατάψυξης, σχεδόν το σύνολο του όγκου του νερού παγώνει. Με την προσθήκη του κρυοπροστατευτικού ο πάχος καταλαμβάνει μικρότερο μέρος του όγκου του διαλύματος και τα κύτταρα έτσι έχουν περισσότερο χώρο διαθέσιμο για να επιβιώσουν μεταξύ των κρυστάλλων. Μία συγκέντρωση 5-10% του κρυοπροστατευτικού συνήθως απαιτείται για να επιτραπεί η επιβίωση ενός σημαντικού κλάσματος των απομονωμένων κυττάρων μετά από ψύξη-απόψυξη σε υγρό άζωτο στους  $-196^{\circ}\text{C}$ .

Οι διαδικασίες κατάψυξης και κρυοσυντήρησης εφαρμόζονται κατά βάση σε νωπό σπέρμα, στο οποίο προστίθεται το κρυοπροστατευτικό υλικό. Γενικά για να χρησιμοποιηθεί μία ουσία ως κρυοπροστατευτικό πρέπει να εμφανίζει τα παρακάτω χαρακτηριστικά :

- 1 Να μην είναι τοξικό
- 2 Να έχει μικρό μοριακό βάρος
- 3 Να παρουσιάζει μικρή διαλυτότητα στο νερό
- 4 Να έχει την ικανότητα να διαπερνά το κυτταρικό τοίχωμα
- 5 Να απομακρύνεται εύκολα με το πλύσιμο [7]

Το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο κρυοπροστατευτικό για την κρυοσυντήρηση ανθρώπινου σπέρματος είναι η γλυκερόλη. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην υψηλή διαλυτότητα της γλυκερόλης στο νερό και στη χαμηλή τοξικότητα που παρουσιάζει στα κύτταρα κατά την έκθεσή τους σε αυτήν για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Τόσο η γλυκερόλη, όσο και το DMSO, είναι ουσίες μικρού μοριακού βάρους που έχουν την ικανότητα να διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη, ανήκουν δηλαδή στην κατηγορία των διεισδυτικών κρυοπροστατευτικών.



Κρυοπροστασία μπορούν επίσης να παρέχουν και ουσίες μεγάλου μοριακού βάρους, που δεν έχουν τη δυνατότητα να διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη. Ο κρυοπροστατευτικός ρόλος των ουσιών αυτών έγκειται στο γεγονός ότι αναστέλλουν την ανάπτυξη κρυστάλλων πάγου ενδοκυτταρικά, απομακρύνοντας το νερό από το κυτταρόπλασμα, και προκαλώντας έτσι αφυδάτωση. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν η σουκρόζη, η γλυκόζη, το PVP κ.α. Στα διαλύματα που χρησιμοποιούνται για την κρυοπροστασία των κυττάρων συνυπάρχουν και άλλες ουσίες, όπως παράγοντες που σταθεροποιούν την πλασματική μεμβράνη, EDTA ή κιτρικό που δεσμεύει το ασβέστιο και ελαττώνει τις διαφορές της συγκέντρωσής κατά μήκος της μεμβράνης και ρυθμιστικά διαλύματα, για την ρύθμιση του pH [8,10,11].

Μία ακόμη παράμετρος κριτικής σημασίας για την επιτυχία της κρυοσυντήρησης, είναι ο ρυθμός προσθήκης και αφαίρεσης του κρυοπροστατευτικού. Καθώς προστίθεται το κρυοπροστατευτικό αυξάνεται η οσμωμοριακότητα του διαλύματος στον εξωκυττάριο χώρο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη συρρίκνωση του κυττάρου, αφού μεγάλη ποσότητα νερού διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη προς τον εξωκυττάριο χώρο. Στη συνέχεια, όταν το κρυοπροστατευτικό αρχίσει να εισέρχεται στο εσωτερικό του κυττάρου, το νερό ακολουθεί αντίθετη πορεία, προκαλώντας τη διόγκωση του κυττάρου. Η συγκέντρωση δηλαδή του κρυοπροστατευτικού εξισώνεται εντός και εκτός του κυττάρου και τότε τα κύτταρα επιστρέφουν στον επιθυμητό όγκο, που θα επιτρέψει την επιβίωσή τους κατά τη διαδικασία της ψύξης.

Η προσθήκη των κρυοπροστατευτικών μπορεί να γίνει σε ένα βήμα ή σταδιακά. Στην πρώτη περίπτωση το κρυοπροστατευτικό προστίθεται απότομα και αμέσως μετά τα κύτταρα καταψύχονται, οπότε ελαττώνεται ο χρόνος κατά τον οποίο τα κύτταρα εκτίθενται στο κρυοπροστατευτικό. Αντίθετα, στην περίπτωση που το κρυοπροστατευτικό προστεθεί σταδιακά, τα κύτταρα δεν υφίστανται οσμωτικό στρες και αυτό έχει ως αποτέλεσμα να διατηρείται ο όγκος των κυττάρων εντός των επιτρεπτών του ορίων. Γενικά, αν η αυξομείωση στο μέγεθος του κυττάρου είναι απότομη το κύτταρο ξεπερνάει τα επιτρεπτά όρια του και επέρχεται μη αντιστρεπτή βλάβη. Τα σπερματοζωάρια μπορούν να αυξήσουν το μέγεθός τους κατά 110% και μπορούν να συρρικνωθούν στο 75% του όγκου τους χωρίς αλλοίωση της κινητικότητάς τους. Επομένως, ο ρυθμός προσθήκης του κρυοπροστατευτικού θα πρέπει να είναι τέτοιος ώστε να μην μεταβάλλεται δραματικά ο όγκος του κυττάρου με συνέπεια το εσωτερικό και το εξωτερικό του κυττάρου να βρίσκεται σε μία διαρκή ισορροπία [8].



## 4.4 ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ, ΣΠΕΡΜΑ ΚΑΙ ΒΙΤΑΜΙΝΗ D

Το κρυοσυντηρούμενο σπέρμα χρησιμοποιείται συστηματικά στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή. Ωστόσο, λεπτομερής εξέταση υποδηλώνει ότι η αναλογία πλήρως λειτουργικού σπέρματος ανά δείγμα με κατάψυξη-απόψυξη είναι σημαντικά μειωμένη [31]. Υπάρχουν διάφορα χαρακτηριστικά ενός σπερματοζωαρίου που είναι απαραίτητα για τη γονιμοποίηση ενός ωαρίου, τα οποία πρέπει να διατηρηθούν μετά από την κρυοσυντήρηση. Τα σημαντικότερα από αυτά τα χαρακτηριστικά μπορεί να συνοψιστούν ως περιεχόμενο DNA, ακροσωμική ακεραιότητα, κινητικότητα και βιωσιμότητα [25].

Η ύπαρξη καλής ποιότητας DNA στο σπέρμα είναι υψίστης σημασίας για τη σωστή μεταφορά γενετικού υλικού από τη μία γενιά στην επόμενη, για αυτό οι πρόσθετες ζημιές που προκαλούνται από την κατάψυξη και την απόψυξη μπορεί να έχουν επιζήμιες συνέπειες. Η κυτταρική βλάβη κατά τη διάρκεια της κατάψυξης συνήθως αποδίδεται σε ρήξη της μεμβράνης που προκαλείται είτε από το σχηματισμό ενδοκυτταρικών κρυστάλλων πάγου και οσμωτικών επιδράσεων κατά την ταχεία κρυοσυντήρηση είτε από μηχανική δύναμη από τον σχηματισμό εξωκυτταρικού πάγου κατά την μέθοδο της αργής κρυοσυντήρησης. Επομένως, είναι ζωτικής σημασίας να διασφαλιστεί ότι το σπέρμα είναι κατεψυγμένο με τέτοιο τρόπο ώστε να προσφέρει μέγιστη προστασία στο DNA, ώστε να αποφευχθεί η πιθανή μεταφορά βλαβών στους απογόνους [15,19]. Σπερματοζωάρια με κατεστραμμένο γενετικό υλικό είναι ακόμα ικανά να γονιμοποιήσουν. Έτσι, οι μεταλλάξεις και οι ανωμαλίες μπορεί να μην γίνουν αντιληπτές μέχρι να διαχωριστεί το έμβρυο ή να αναπτυχθεί. Οι περισσότερες γενετικές ανωμαλίες που προέρχονται από σπέρμα συμβαίνουν μέσω χρωμοσωμικής θραύσης παρά χρωμοσωμικής αναδιάταξης, όπως στο ωοκύτταρο [17,18].

Έχει παρατηρηθεί ότι μεταξύ όλων των οργανιδίων, τα ακροσώματα επηρεάζονται αρκετά από την διαδικασία της κατάψυξης-απόψυξης. Είναι πιθανό ότι η ακροσωμική δομή, με τις ευαίσθητες και εύθραυστες μεμβράνες, είναι πιο επιρρεπής στις φυσικές και χημικές επιδράσεις και στις ιοντικές αλλαγές. Επιπλέον, το ακρόσωμα είναι ένα ζωτικό οργανίδιο το οποίο διευκολύνει τη διέλευση των σπερματοζωαρίων μέσω της zona pellucida (ωοφόρος δίσκος) του ωοκυττάρου προκειμένου να επιτύχει γονιμοποίηση [20]. Οι χαμηλές θερμοκρασίες αυξάνουν τα κυτταροπλασματικά επίπεδα  $Ca^{+2}$ , τις αντιδράσεις που μοιάζουν με την ενεργοποίηση και την εξωκυττάρωση του περιεχομένου των ακροσωμάτων.

Τα νεκρά σπερματοζωάρια υποβάλλονται συχνά σε εκφυλιστική απώλεια ακροσωμάτων, έτσι είναι πιθανό ότι η επαγόμενη από κρυοσυντήρηση μείωση της ακροσωμικής ακεραιότητας και της συνολικής περιεκτικότητας σε ακροσίνη προέρχεται από τον κυτταρικό θάνατο και ίσως να μην παρατηρούνται στα ζωντανά

κύτταρα [35]. Εάν η απώλεια ακροσωμάτων σχετίζεται με κυτταρικό θάνατο, τότε η μέτρηση της ακροσωμικής κατάστασης είναι πιθανό να παρέχει οποιαδήποτε πληροφορία σχετικά με το cryodamage που δεν μπορεί να επιτευχθεί με την αξιολόγηση της κινητικότητας ή της βιωσιμότητας του σπέρματος [35].

Η κινητικότητα αποτελεί μία από τις παραμέτρους που επηρεάζονται σοβαρότερα από την κατάψυξη [32]. Είναι επίσης ένας ισχυρός προγνωστικός παράγοντας της ικανότητας ενός δεδομένου δείγματος να επιτύχει γονιμοποίηση *in vitro* [33]. Παρά τη σπουδαιότητά της, ο μηχανισμός με τον οποίο μειώνεται η κινητικότητα δεν έχει διευκρινιστεί. Η κινητικότητα του σπέρματος εξαρτάται εν μέρει από τη λειτουργία των μιτοχονδρίων [34]. Τα μιτοχόνδρια περιτυλίσσονται στρατηγικά γύρω από το μεσαίο τμήμα του σπερματοζωαρίου για να παρέχουν ενέργεια στα νήματα της ουράς, διευκολύνοντας έτσι την αποτελεσματική προώθηση του σπέρματος τόσο για να φτάσει στο ωοκύτταρο όσο και για να διεισδύσει την *zona pellucida*. Τα μιτοχόνδρια είναι η κύρια πηγή της οξειδωτικής ενέργειας του κυττάρου μέσω της παραγωγής του ATP. Έχει βρεθεί ότι επηρεάζεται η λειτουργία των μιτοχονδρίων με την κρυοσυντήρηση. Αυτό υποδηλώνει ότι η μείωση της κινητικότητας μπορεί να εξηγηθεί από μία βλάβη της μιτοχονδριακής δραστηριότητας [30].

Είναι σαφές ότι η μορφολογική δομή του σπερματοζωαρίου είναι εξαιρετικά σημαντική για τις διαδικασίες της γονιμοποίησης και της ανάπτυξης των εμβρύων. Επομένως, είναι κρίσιμο να επιλεγούν τα πιο βιώσιμα σπερματοζωάρια και να αποκλειστούν τα κατεστραμμένα μετά από κρυοσυντήρηση. Η βιωσιμότητα των σπερματοζωαρίων μειώθηκε σημαντικά μετά από την διαδικασία κατάψυξης και απόψυξης [25,21]. Ο πιο πιθανός λόγος για αυτό το αποτέλεσμα φαίνεται να είναι το φυσικό και χημικό περιβάλλον στο οποίο εκτίθεται ένα σπερματοζωάριο. Ο σχηματισμός κρυστάλλων πάγου έξω από το κύτταρο είναι ο κύριος παράγοντας που επηρεάζει φυσικά τη μορφολογία των κυττάρων. Ο σχηματισμός πάγου γύρω από τα κύτταρα συγκεντρώνει γρήγορα την περιβάλλουσα μήτρα, αφήνοντας τα κύτταρα σε υγρά που περιέχουν υψηλή περιεκτικότητα σε διαλυμένες ουσίες [22]. Επίσης, η ανταλλαγή νερού - κρυοπροστατευτικού (CPA) που παρατηρείται στα κύτταρα κατά τη διάρκεια των πρώτων σταδίων της διαδικασίας προκαλεί οίδημα και συρρίκνωση των κυττάρων που μπορεί να μην είναι ανεκτή για την πλειοψηφία των οργανιδίων [20].

Αναφέρεται ευρέως ότι η κατάψυξη και η απόψυξη του σπέρματος όχι μόνο μεταβάλλει τη κινητικότητα και τη ζωτικότητα του αλλά προκαλεί επίσης αύξηση της βλάβης του DNA του σπέρματος [36,37,38]. Ο μηχανισμός πίσω από αυτές τις καταστροφές μπορεί να σχετίζεται με το ψυχρό σοκ, το οσμωτικό στρες και τον ενδοκυτταρικό πάγο που σχηματίζεται κατά τη διάρκεια της κρυοσυντήρησης [39]. Αυτά τα φαινόμενα προκαλούν κυτταρικό τραυματισμό και επηρεάζουν τις λειτουργίες των οργάνων του σπέρματος. Στην πραγματικότητα, αποδείχθηκε ότι οι μεμβράνες και ο κυτταροσκελετός είναι ευαίσθητα στη θερμοκρασία. Η ρευστότητα



της μεμβράνης και οι μιτοχονδριακές λειτουργίες επηρεάζονται κατά τη διάρκεια της κρυοσυντήρησης του σπέρματος [39]. Επιπλέον, ισχυρά αποδεικτικά στοιχεία προτείνουν ότι η κατάψυξη-απόψυξη των σπερματοζωαρίων σχετίζεται με αύξηση των δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS). Τα ROS, που παράγονται εντός των μιτοχονδρίων, συντίθενται υπερβολικά κατά τη διάρκεια της κατάψυξης / απόψυξης και θα μπορούσαν να επιτεθούν σε όλα τα κυτταρικά συστατικά συμπεριλαμβανομένου του DNA [36,39].

Τα αντιδραστικά είδη οξυγόνου (ROS), τα οποία παράγονται με το ψυχρό σοκ και το οσμωτικό στρες αυτής της διαδικασίας, επηρεάζουν τα οργάνδια του σπέρματος. Η έκθεση σε υψηλές συγκεντρώσεις ROS μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τη διάσπαση των μιτοχονδριακών και πλασματικών μεμβρανών, που προκαλεί κατακερματισμό των χρωμοσωμάτων και του DNA και επιφέρει μείωση της κινητικότητας του σπέρματος. Έχει αποδειχθεί ότι το ανθρώπινο σπέρμα παράγει ROS σε φυσιολογικές ποσότητες, οι οποίες παίζουν ρόλο στις λειτουργίες του σπέρματος κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησής του, της ακροσωμικής αντίδρασης και της σύντηξης του με το ωοκύτταρο. Ωστόσο, η ανεξέλεγκτη και υπερβολική παραγωγή ROS, όταν υπερνικά τις αντιοξειδωτικές άμυνες στο σπέρμα, έχει ως αποτέλεσμα το οξειδωτικό στρες [12,13].

Οι δυσμενείς επιδράσεις της οξείδωσης μπορούν να μειωθούν από τα αντιοξειδωτικά που είναι παρόντα στο σπερματικό πλάσμα. Τα σωματικά κύτταρα περιέχουν αντιοξειδωτικά μέσα στο κυτταρόπλασμα τους. Ωστόσο, το σπέρμα χάνει το μεγαλύτερο μέρος του κυτταροπλάσματός του κατά την ωρίμασή και ως εκ τούτου στερείται των ενδογενών και ενζυματικών μηχανισμών αποκατάστασης που παρατηρούνται σε άλλους τύπους κυττάρων. Υπάρχει φυσιολογικά μια ισορροπία μεταξύ της παραγωγής ROS και των σπερματικών αντιοξειδωτικών. Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να προστατεύσουν το σπέρμα από τις επιδράσεις των ROS. Ειδικά, η βιταμίνη E μπορεί να σπάσει τους ομοιοπολικούς δεσμούς που έχουν σχηματίσει οι ROS μεταξύ των πλευρικών αλυσίδων λιπαρών οξέων στα λιπίδια της μεμβράνης και είναι μία από τις κύριες προστασίες της μεμβράνης κατά των ROS [13,14].



## **5 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **5.1.1 ΑΣΘΕΝΕΙΣ**

Για την πραγματοποίηση της παρούσας έρευνας χρησιμοποιήθηκαν 18 δείγματα σπέρματος που προέρχονταν από ενήλικους άντρες που κατέφευγαν στην Μονάδα Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας είτε για την πραγματοποίηση κάποιου κύκλου εξωσωματικής είτε για ένα συμβατικό σπερμοδιάγραμμα στο χρονικό διάστημα Ιουνίου-Σεπτεμβρίου 2017.

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί αυτό είχαν προηγηθεί όλες οι απαιτούμενες διαδικασίες για τη προετοιμασία αυτών των ενεργειών στην Μονάδα, όπως είναι το ιστορικό των ασθενών, τα δημογραφικά τους στοιχεία, παλιότερα σπερμοδιαγράμματα και άλλα απαραίτητα στοιχεία ανάλογα με την εξέταση. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν είχαν κυρίως φυσιολογικές παραμέτρους αλλά υπήρχαν και κάποια παθολογικά που όμως δεν περιόριζαν το πείραμα μας, για παράδειγμα μικρός όγκος, μορφολογία <4% κ.α.

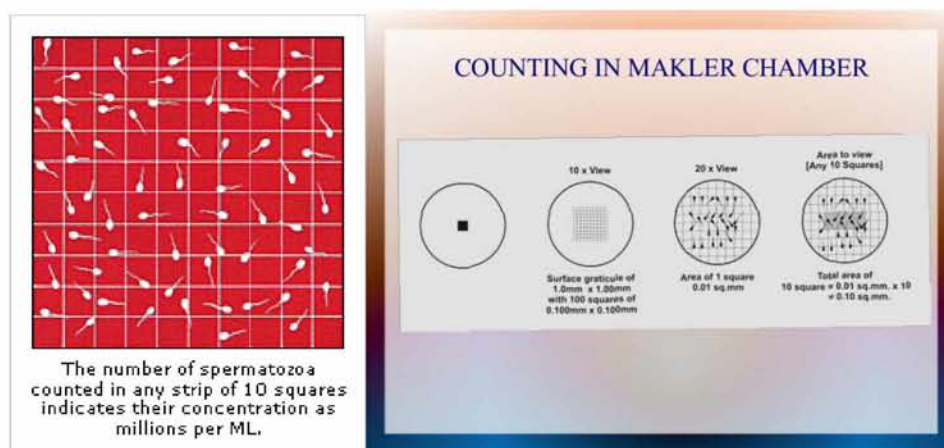
### **5.1.2 ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ**

Η συλλογή των δειγμάτων γίνεται στο ειδικά διαμορφωμένο δωμάτιο της Μονάδας που βρίσκεται δίπλα από το εργαστήριο επεξεργασίας σπέρματος. Ο ασθενής οδηγείται στο δωμάτιο και συλλέγει το δείγμα του με αυνανισμό σε ουροσυλλέκτη (urobox) πάνω στο οποίο αναγράφεται το ονοματεπώνυμο του, αν πρόκειται για σπερμοδιάγραμμα, ή το ονοματεπώνυμο της συζύγου του, αν πρόκειται για εξωσωματική γονιμοποίηση ή σπερματέγχυση. Στη συνέχεια συλλέγεται από εμάς και αφήνεται να ρευστοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου μέσα στο hood για 15-30 λεπτά.

### **5.1.3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ**

Εφόσον παραληφθεί το δείγμα και ρευστοποιηθεί κάτω από φυσιολογικές συνθήκες είναι απαραίτητη η μακροσκοπική και μικροσκοπική του εκτίμηση, προκειμένου να υπάρχουν μετρήσεις πριν το πείραμα για να είναι εύκολη η σύγκριση. Για τον σκοπό αυτό υπολογίζεται αρχικά ο όγκος του δείγματος σε ml με την βοήθεια πιπέτας προκειμένου να είναι ακριβής, καθώς και η ύπαρξη ή όχι ιζήδους. Στη συνέχεια, 10μl του νωπού δείγματος τοποθετούνται στο Makler Counting Chamber, που αναφέραμε προηγουμένως, ώστε να γίνει εκτίμηση της κινητικότητας του. Το όργανο που χρησιμοποιείται είναι ένα μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης με μεγέθυνση x10 στους προσοφθάλμιους φακούς και x25 στους αντικειμενικούς.

Στο οπτικό πεδίο εμφανίζεται ένα πλέγμα 100 τετραγώνων χαρακτηριστικό του Makler (Εικόνα 3), που μας βοηθάει περισσότερο στην εστίαση των σπερματοζωαρίων αλλά και στην εύκολη μέτρηση τους και αναγωγή τους σε εκατομμύρια ανά ml. Ο καθορισμός της συγκέντρωσης των σπερματοζωαρίων του δείγματος γίνεται με την μέτρηση σε μία σειρά 10 τετραγώνων είτε οριζόντια είτε κάθετα και την απευθείας αναγωγή τους. Με γνωστή την συγκέντρωση και με τον ίδιο τρόπο μέτρησης υπολογίζονται τα ποσοστά της προωθητικής κίνησης ( $PR=a+b$ ), της επιτόπιας κίνησης ( $NP=c$ ) και της ακινησίας ( $IM=d$ ). Είναι συνετό να καταμετρούνται και περιοχές εκτός των τετραγώνων προκειμένου να είναι συνολική η μέτρηση. Επίσης, για μεγαλύτερη ακρίβεια γίνονται επαναληπτικές μετρήσεις και υπολογίζεται ο μέσος όρος των τιμών που προκύπτουν.



Εικόνα 3

Πριν ξεκινήσει η βασική πειραματική διαδικασία είναι απαραίτητη η προετοιμασία δύο διαλυμάτων 1,25 βιταμίνης D σε τελικές συγκεντρώσεις 0,01 και 0,1 nM. Η βιταμίνη είναι διαθέσιμη σε μορφή σκόνης και διαλύθηκε σε buffer medium, λαμβάνοντας υπόψη τις οδηγίες της εταιρείας, με κατάλληλες αραιώσεις προκειμένου να προκύψουν οι επιθυμητές συγκεντρώσεις.

Αφού ολοκληρωθεί η εκτίμηση του δείγματος και έχουν σημειωθεί τα αποτελέσματα, τοποθετώ σε falcon 15ml >2ml νωπού δείγματος και το φυγοκεντρώ για 7-8 λεπτά στα 1500rpm. Παράλληλα με αυτή την διαδικασία έχω βγάλει από το ψυγείο του εργαστηρίου το Cryopreservation Sperm Buffer, προκειμένου να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου. Αφού τελειώσει η φυγοκέντρωση, αφαιρώ πολύ προσεκτικά, με το falcon σε κλίση, το υπερκείμενο αφήνοντας ίζημα περίπου 150-200μl. Στη συνέχεια, προσθέτω το buffer υπολογίζοντας ο τελικός όγκος να είναι ~900μl, καθώς θέλω μετέπειτα να το χωρίσω σε 3 περαιτέρω δείγματα, ένα control και δυο με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις της βιταμίνης D. Έπειτα, χωρίζω το δείγμα σε 3



cryopreservation vials, τα οποία έχουν σημειωθεί με τον αντίστοιχο αριθμό δείγματος, την ημερομηνία και C, 0.01 και 0,1 (για control και συγκεντρώσεις 0,01 και 0,1 nM αντίστοιχα). Στα δείγματα με τις συγκεντρώσεις προστίθενται 400μl και στο control ότι απομένει από το αρχικό δείγμα με το κρυοπροστατευτικό. Τέλος, προσθέτω 1μl βιταμίνης D ανάλογης συγκέντρωσης στα 2 κατάλληλα σημειωμένα vials και αφήνω να επωαστεί για 10 λεπτά. Μετά το πέρας αυτού του χρόνου, βυθίζω τα δείγματα κατευθείαν στο υγρό άζωτο ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) και τα αφήνω εκεί έως ότου αποψυχθούν.

Η απόψυξη έγινε την ίδια μέρα για όλα τα δείγματα μαζί. Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε υδατόλουτρο στους  $\sim 37^{\circ}\text{C}$ , όπου τα δείγματα αφέθηκαν για 10 λεπτά. Στη συνέχεια, χωρίς καμία περαιτέρω επεξεργασία και μετά το πέρας 30 λεπτών, με την σειρά που καταψύχθηκαν και με την βοήθεια και πάλι του μικροσκοπίου και του Makler Counting Chamber, μετρήθηκαν η συγκέντρωση και η κινητικότητα των control δειγμάτων και των δειγμάτων με τις δυο διαφορετικές συγκεντρώσεις βιταμίνης D, όπως περιγράψαμε παραπάνω. Τέλος, έγινε σύγκριση των εκτιμήσεων πριν και μετά την κατάψυξη και την επίδραση των συγκεντρώσεων βιταμίνης που παρατίθεται στο κεφάλαιο αποτελέσματα.

Στην παρούσα εργασία θα ελεγχθεί η επίδραση της συγκέντρωσης 0,1 nM της βιταμίνης D, παρόλο που το πείραμα έγινε ταυτόχρονα και για τις δύο συγκεντρώσεις. Για την στατιστική ανάλυση και παρουσίαση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα IBM SPSS (paired t-test) και Microsoft Excel 2013.



## 6 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 6.1 ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΩΝ

Ο συνολικός αριθμός των δειγμάτων που μελετήθηκαν στα πλαίσια της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας και συμπεριλήφθηκαν στην στατιστική ανάλυση είναι 17. Το 18<sup>ο</sup> δείγμα δεν συμπεριλήφθηκε στα στατιστικά αποτελέσματα καθώς ανήκε στην κατηγορία των ολιγοσπερμικών ανδρών και αλλοίωνε την έκβαση των αποτελεσμάτων. Στον πίνακα 6.1 παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά των εξεταζομένων, τα οποία πιθανό να δίνουν χρήσιμες πληροφορίες για την ποιότητα του σπέρματος τους.

Στοιχεία Δειγμάτων	Μέση Τιμή ± Τυπική Απόκλιση
Ηλικία (έτη)	40,5 ± 5,55
Όγκος σπέρματος V (ml)	3,26 ± 1,07
Συγκέντρωση Σπέρματος C (εκ/ml )	39,11 ± 57,58
Κάπνισμα (ποσοστό %)	41,18 OXI
	58,82 NAI
Αλκοόλ (ποσοστό %)	52,95 OXI
	47,05 NAI

Πίνακας 6.1 Δημογραφικά στοιχεία εξεταζομένων

## 6.2 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ

Τα νωπά δείγματα σπέρματος εξετάστηκαν μετά την ρευστοποίηση τους περίπου 20-30 λεπτά αφότου συλλέχθηκαν. Όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 2.3 (κινητικότητα σπερματοζωαρίων), η κινητικότητα των δειγμάτων χωρίζεται σε τρεις κατηγορίες: την προωθητική κίνηση (PRM), την επιτόπια κίνηση (NPM) και την ακινησία (IM). Σύμφωνα με την προηγούμενη ισχύουσα κατηγοριοποίηση κατά WHO (4<sup>th</sup> edition, 1999), τα σπερματοζώαρια κατατάσσονταν σε τέσσερις ομάδες, την ταχεία προωθητική κίνηση (a), την νωθρή προωθητική ή στροβιλοειδής κίνηση (b), την επιτόπια κίνηση (c) και την ακινησία (d). Η αντιστοιχία των κατηγοριών αυτών με τις ισχύουσες σημερινές φαίνεται παρακάτω. Στον Πίνακα 6.2 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα τις κινητικότητας των 17 δειγμάτων πριν την κατάψυξη και την προσθήκη βιταμίνης (νωπό), καθώς και μετά τη απόψυξη και την προσθήκη βιταμίνης του δείγματος ελέγχου και των δειγμάτων με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις βιταμίνης D.

n=17, ποσοστό (%)	PRM ( a+b )	NPM ( c )	IM ( d )
Νωπό	42,08 ± 16,16	21,05 ± 6,78	36,82 ± 16,18
<b>ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΑΠΟΨΥΞΗ</b>			
Δείγμα ελέγχου	19,79 ± 14,32	14,32 ± 8,32	65,88 ± 16,39
Βιταμίνη D [0,01nM]	14,17 ± 10,88	13,88 ± 8,82	71,97 ± 16,96
Βιταμίνη D [0,1nM]	15,70 ± 10,54	15,97 ± 10,44	68,29 ± 17,71

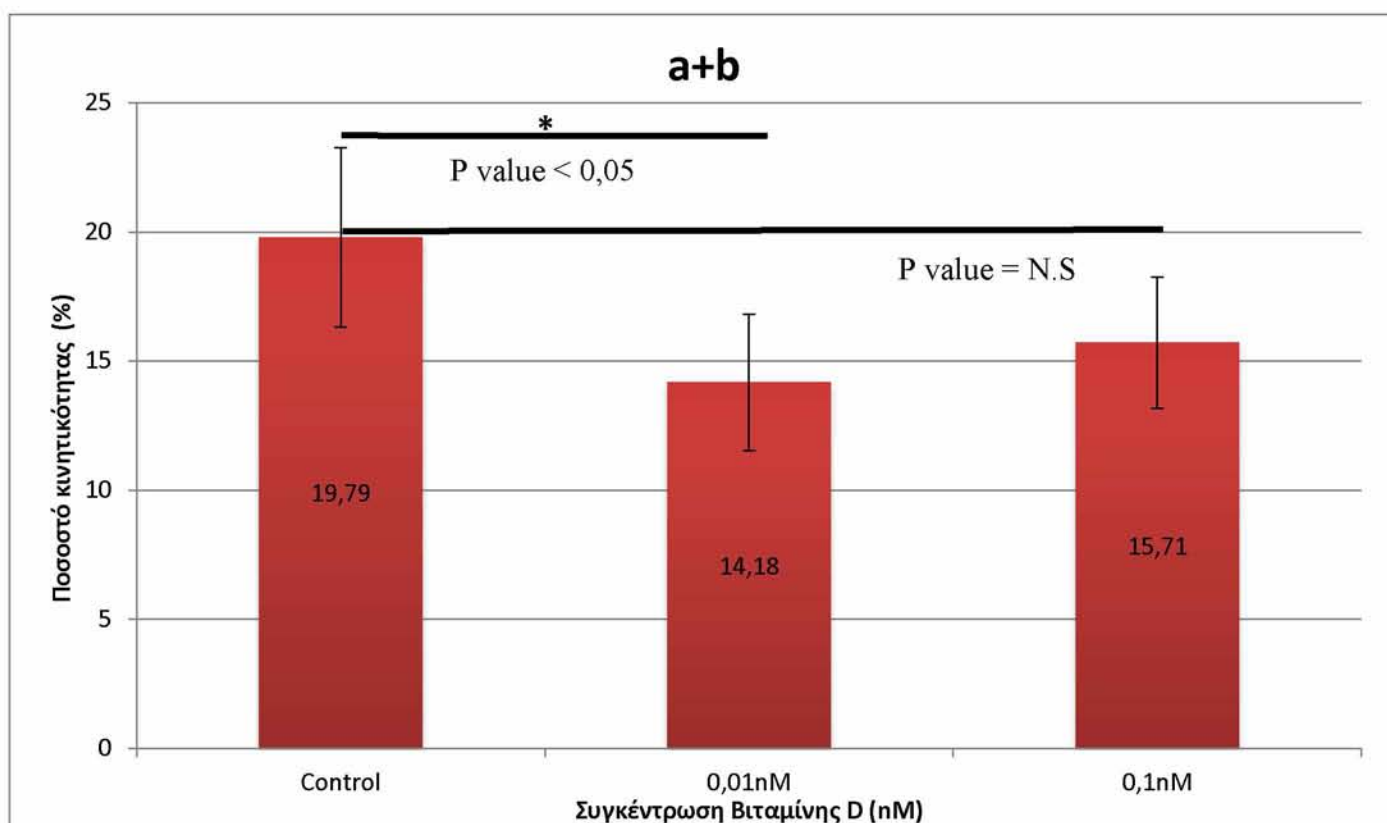
Πίνακας 6.2 Κινητικότητα αρχικών δειγμάτων (νωπό) πριν την κατάψυξη, δείγματος ελέγχου μετά την απόψυξη και δειγμάτων βιταμίνης D συγκέντρωσης 0,01 nM και 0,1nM.

## 6.3 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Από την εφαρμογή του t-test στο πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης SPSS και του Microsoft Excel, προκύπτουν τα παρακάτω δύο γραφήματα στα οποία συγκρίνεται η ίδια κινητικότητα κάθε φορά μεταξύ των δειγμάτων ελέγχου και των δειγμάτων με τις συγκεντρώσεις της βιταμίνης D. Στην παρούσα διπλωματική εργασία θα συζητηθούν τα αποτελέσματα για την συγκέντρωση 0,1nM βιταμίνης.

Τα ποσοστά προωθητικής κίνησης των δειγμάτων με την επίδραση βιταμίνης D συγκέντρωσης 0,1nM σε σύγκριση με τα δείγματα ελέγχου μετά την διαδικασία της κατάψυξης- απόψυξης δεν φαίνεται να έχουν κάποια συσχέτιση καθώς

$P \text{ value}(0,18) > 0,05$ . Επομένως, η διαφορά μεταξύ των δειγμάτων χωρίς και με την επίδραση της βιταμίνης D μετά την απόψυξη ως προς την κίνηση PRM ( a+b) **δεν είναι στατιστικά σημαντική** και αυτό αποδεικνύεται και στο διάγραμμα 6.1.



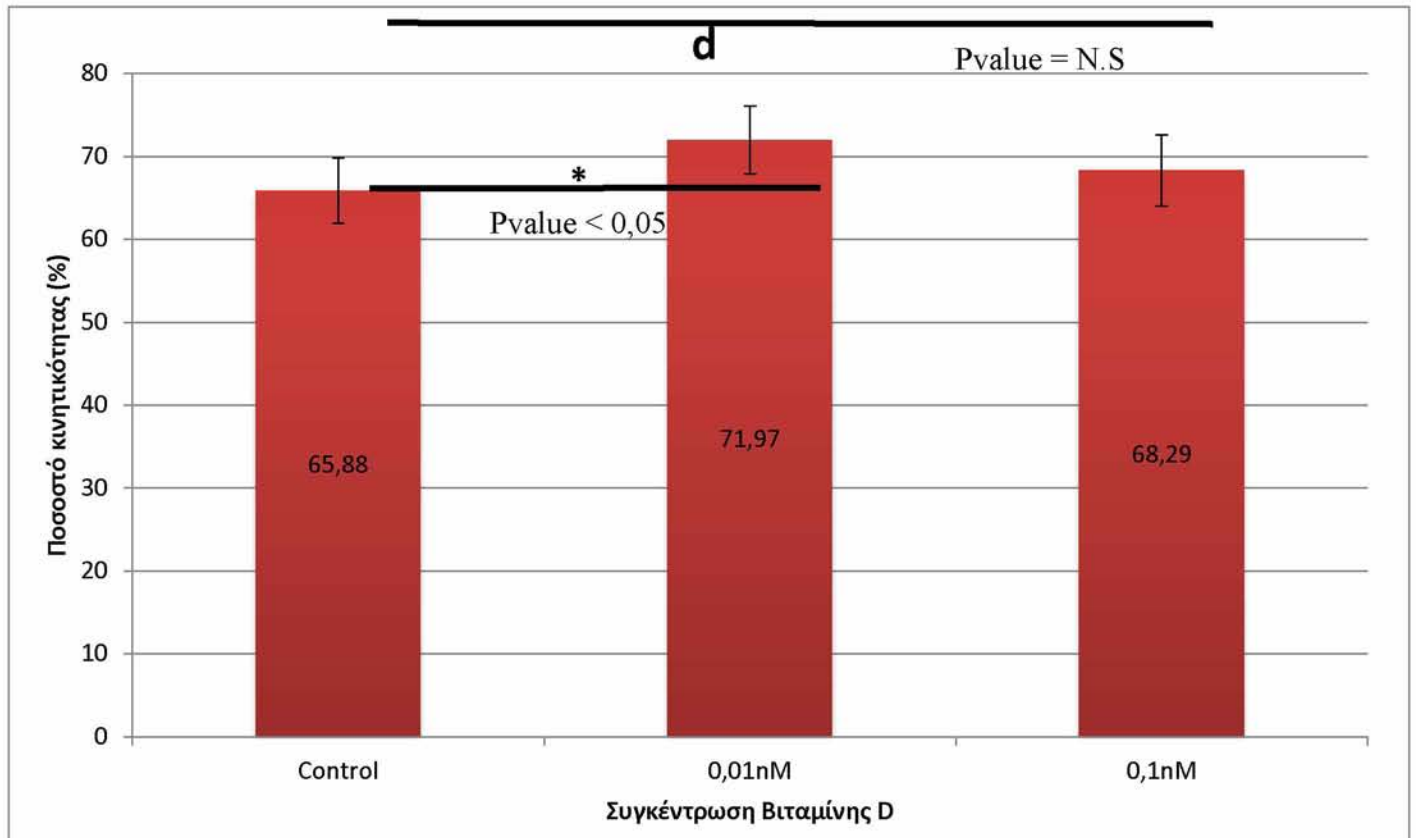
Διάγραμμα 6.1 Ποσοστά προωθητικής κίνησης (PRM= a+b) στα δείγματα ελέγχου και στα δείγματα με συγκέντρωση βιταμίνης D 0,01nM και 0,1nM που μετρήθηκαν μετά από την απόψυξη.

Παρατηρούμε στο διάγραμμα ότι η περιοχή αλληλοεπικάλυψης των roll-bar των δύο στηλών είναι σχετικά μεγάλη, γεγονός που επιβεβαιώνει το παραπάνω αποτέλεσμα που βρέθηκε από το P value, δηλαδή τη μη στατιστικά σημαντική διαφορά.

Το ίδιο αποτέλεσμα προκύπτει και από την σύγκριση των δειγμάτων ελέγχου και των δειγμάτων με επίδραση βιταμίνης D συγκέντρωσης 0,1nM για τα ακίνητα σπερματοζώρια. Το Pvalue που προκύπτει σε αυτή την περίπτωση είναι της τάξεως του 0,56  $\gg 0,05$ , γεγονός που αποδεικνύει ότι φαίνεται να μην υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των δυο ποσοστών ακινησίας. Επομένως, η διαφορά των δειγμάτων χωρίς και με τη επίδραση της βιταμίνης D (0,1nM) μετά την απόψυξη για τα ποσοστά ακινησίας (IM= d) φαίνεται να **μην είναι στατιστικά σημαντική**.



Αυτό επαληθεύεται και από το διάγραμμα 6.2, όπου παρατηρούμαι πως τα roll-bar των αντίστοιχων εξεταζόμενων στηλών αλληλεπικαλύπτονται σχεδόν σε όλη τους την επιφάνεια. Όσο μεγαλύτερα είναι η περιοχή αλληλοεπικάλυψης τόσο λιγότερο στατιστικά σημαντική είναι η διαφορά μεταξύ των δειγμάτων.



Διάγραμμα 6.2 Ποσοστά ακινησίας (IM= d) στα δείγματα ελέγχου και στα δείγματα με συγκέντρωση βιταμίνης D 0.01nM και 0.1nM που μετρήθηκαν μετά από την απόψυξη.

## 7 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η «υπογονιμότητα» ορίζεται ως η αδυναμία ενός ζευγαριού να επιτύχει σύλληψη και να αποκτήσει τέκνο έπειτα από τουλάχιστον ένα έτος τακτικών σεξουαλικών επαφών χωρίς αντισυλληπτική προστασία. Δεν πρέπει να συγχέεται με την «στεριότητα», που είναι η απόλυτη βιολογική αδυναμία τεκνοποίησης. Σύμφωνα με τον ορισμό της υγείας, όπως αυτός έχει διατυπωθεί από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (Π.Ο.Υ.), η υπογονιμότητα αποτελεί διαταραχή της υγείας και χρήζει αντιμετώπισης

Σύμφωνα με διάφορες επιδημιολογικές μελέτες και εκτιμήσεις του Π.Ο.Υ., περίπου το 8-12% των ζευγαριών που βρίσκονται σε αναπαραγωγική ηλικία αντιμετωπίζει κάποιας μορφής δυσκολία στην προσπάθειά του να αποκτήσει απογόνους. Η συχνότητα της υπογονιμότητας είναι σχεδόν η ίδια στους άνδρες και τις γυναίκες. Μετά τον ενδελεχή διαγνωστικό έλεγχο, η υπογονιμότητα παραμένει ανεξήγητη μόνο στην μειονότητα των ζευγαριών. Σε πολύ αδρές γραμμές, η υπογονιμότητα οφείλεται είτε σε φλεγμονές του γεννητικού συστήματος, είτε σε ορμονικές διαταραχές (και οι μεν και οι δε προκαλούν συγκεκριμένες δυσλειτουργίες).

Σήμερα γνωρίζουμε ότι ο τρόπος ζωής και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες επηρεάζουν την γονιμότητα των ανδρών. Όταν αναφερόμαστε στον τρόπο ζωής εννοούμε και την διατροφή, μέσω της οποίας γίνεται η πρόσληψη αρκετών ιχνοστοιχείων, πρωτεϊνών, βιταμινών. Στις βιταμίνες επικεντρωθήκαμε και εμείς στην παρούσα εργασία και πιο συγκεκριμένα στην βιταμίνη D, και μάλιστα την ενεργή της μορφή, 1,25-διϋδροξυχοληκαλσιφερόλη, 1,25 (OH) <sup>2</sup>D<sub>3</sub> και σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αυτής. Η βιταμίνη D είναι μια λιποδιαλυτή βιταμίνη η οποία σχηματίζεται στον οργανισμό κυρίως μέσω της απορρόφησης της ηλιακής υπεριώδους ακτινοβολίας από το δέρμα, αλλά και από ορισμένες τροφές πλούσιες στη βιταμίνη αυτή. Στην πραγματικότητα όμως δεν πρόκειται για βιταμίνη αλλά για μία προ-στεροειδή ορμόνη, η οποία έχει άμεση δράση στα γονίδια μας.

Πειραματικές μελέτες έχουν δείξει τον θετικό ρόλο που παίζει η βιταμίνη D στην ανδρική γονιμότητα κυρίως μέσω της ορμονικής τροποποίησης με γενωμικές και μη δράσεις, και μέσω της ποιοτικής βελτίωσης του σπέρματος με μη γενωμικές δράσεις. Στο ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα, φαίνεται να παρατηρείται μια θετική επίδραση της στην ποιότητα του σπέρματος και συγκεκριμένα στην κινητικότητα, την ενεργοποίηση (capacitation) και την ακροσωμική αντίδραση. Η βιταμίνη D παίζει βασικό ρόλο στην συστηματική ρύθμιση της ομοιόστασης του ασβεστίου και ο ρόλος του ασβεστίου στην ωρίμανση του ανθρώπινου σπερματοζωαρίου έχει καταγραφεί, εφόσον τα επίπεδα του είναι 2-3 φορές περισσότερα στα υγρά της επιδιδυμίδας και του προστάτη σε σχέση με αυτά της κυκλοφορίας [44]. Αναλυτικότερα, υπάρχει θετική συσχέτιση των επιπέδων βιταμίνης D του ορού και της κινητικότητας του σπέρματος, μέσω της απευθείας δράσης της, 1,25-διϋδροξυχοληκαλσιφερόλη, 1,25 (OH) <sup>2</sup>D<sub>3</sub> στην ενδοκυτταρική συγκέντρωση ασβεστίου, την κινητικότητα και την ακροσωμική αντίδραση στα ώριμα σπερματοζωάρια [45].

Προκειμένου να δράσει η βιταμίνη D είναι απαραίτητος ο μεταβολισμός της αρχικά όπως περιγράφηκε σε προηγούμενα κεφάλαια, άρα η παρουσία συγκεκριμένων ενζύμων καθώς και η παρουσία του υποδοχέα, όπου θα προσδεθεί η βιταμίνη



ενεργοποιώντας διάφορους μοριακούς μηχανισμούς. Έχει βρεθεί ότι ο υποδοχέας VDR βρίσκεται στην κεφαλή, στον αυχένα και στην μέτα-ακορωμική περιοχή του σπερματοζωαρίου, σημεία όπου εντοπίζονται και αξιολογες συγκεντρώσεις των απαραίτητων ενζύμων για την σύνθεσή της [46].

Η έκφραση του VDR υποδοχέα και των μεταβολικών ενζύμων της βιταμίνης βρέθηκε μεγαλύτερη σε σπερματοζωάρια καλής ποιότητας που απομένουν μετά την διαδικασία της ενεργοποίησης από την φυγοκέντρωση. Αυτό υποστηρίζεται και σε άλλη μελέτη που επιβεβαιώνει ότι η βιταμίνη D δεν είναι σε θέση να επάγει την κινητικότητα σε σπερματοζωάρια υπογόνιμων ανδρών που δεν έχουν υποστεί την διαδικασία της ενεργοποίησης, καθώς έχουν χαμηλή έκφραση του VDR υποδοχέα και των μεταβολικών ενζύμων [45,46]. Η ακρωμική αντίδραση είναι επίσης εξαρτώμενη από την συγκέντρωση του ασβεστίου και ίσως να επάγεται από την κλιμακωτή αύξηση του ασβεστίου μετά από την διέγερση της βιταμίνης D στην κεφαλή και βρέθηκε ότι η προσθήκη βιταμίνης D σε ενεργοποιημένα σπερματοζωάρια οδήγησε στην αύξηση των κινητών που ακολούθως πραγματοποιούσαν ακρωμική αντίδραση [45].

Αυτή ακριβώς την ευεργετική δράση της βιταμίνης D θέλαμε να εκμεταλλευτούμε προκειμένου να παρακάμψουμε τις αρνητικές επιδράσεις της κρυοσυντήρησης στα δείγματα σπέρματος. Γνωρίζουμε από μελέτες και εμπειρικά, ότι η διαδικασία της κατάψυξης και απόψυξης δειγμάτων σπέρματος είναι αρκετά επιζήμια για την κινητικότητα, την μορφολογία, την βιωσιμότητα και το DNA των σπερματοζωαρίων [15,16].

Έχει βρεθεί αρνητική συσχέτιση μεταξύ της κινητικότητας του σπέρματος, της ζωτικότητας του και της βλάβης που προκαλείται στο DNA του [26]. Φαίνεται ότι τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του σπέρματος είναι αντιπροσωπευτικά της γονιδιακής του κατάστασης. Ορισμένοι συγγραφείς έχουν αναφερθεί σε άμεση φυσική βλάβη στη δομή ή τη λειτουργία του σπέρματος κατά τη διάρκεια της κατάψυξης που σχετίζεται με τον σχηματισμό άγους και την υψηλή οσμωτική πίεση κατά τη διάρκεια της διαδικασίας. Το οξειδωτικό στρες παράγει καταρράκτη ελεύθερων ριζών που οδηγεί σε διεργασία λιπούπεροξείδωσης [27]. Τα αποτελέσματα της υπεροξειδωσίας των λιπιδίων περιλαμβάνουν μη αναστρέψιμη απώλεια κινητικότητας, διαρροή ενδοκυτταρικών ενζύμων, βλάβη του DNA του σπέρματος και ανεπάρκειες στη διείσδυση στα ωοκυττάρια και στη σύντηξη σπέρματος και ωοκυττάρου [28,29].

Οι χαμηλές θερμοκρασίες της κατάψυξης οδηγούν σε αύξηση του κυτταροπλασματικού  $Ca^{2+}$  που αναφέραμε προηγουμένως ότι είναι άμεσα εξαρτημένο με την ενεργοποίηση και την ακρωμική αντίδραση του σπερματοζωαρίου. Επιπλέον, η βιταμίνη D σχετίζεται θετικά με τα επίπεδα ιόντων ασβεστίου στα σπερματοζωάρια γεγονός που μας προϊδεάζει για ένα καλύτερο αποτέλεσμα στα παραμέτρους του σπέρματος που επηρεάζονται από την κατάψυξη.

Σε συμφωνία με αυτά που αναφέρθηκαν παραπάνω και γνωρίζοντας τον μοριακό μηχανισμό δράσης της βιταμίνης D, διαπιστώσαμε στο πείραμα μας ότι η συγκέντρωση 0,1nM της βιταμίνης δεν φαίνεται να είναι επιζήμια για τα σπερματοζωάρια που υπόκεινται σε διαδικασίες κρυοσυντήρησης. Δεν βρέθηκε κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των ποσοστών κινητικότητας των δειγμάτων ελέγχου και των δειγμάτων με επίδραση βιταμίνης D συγκέντρωσης



0,1nM, γεγονός που ήταν και ως ένα βαθμό αναμενόμενο. Μία πιθανή εξήγηση αυτού του ευρήματος είναι η σωστή ενεργοποίηση του υποδοχέα της βιταμίνης VDR, ο οποίος υπάρχει στα σπερματοζώρια ανεξάρτητα της συγκέντρωσης βιταμίνης, με αποτέλεσμα να ενεργοποιείται σωστά ο μοριακός μηχανισμός δράσης του και μέσω μονοπατιών να οδηγούμαστε στον θετικό ρόλο που γνωρίζουμε ότι ασκεί η βιταμίνη D.

Βέβαια, η δράση αυτής της συγκέντρωσης βιταμίνης δεν φαίνεται να είναι ευεργετική απλά έχει παρόμοια αποτελέσματα με αυτά του δείγματος ελέγχου, υποδεικνύοντας ότι μάλλον δεν αντιλαμβανόμαστε απόλυτα την θετική δράση της βιταμίνης στα σπερματοζώρια. Η συγκεκριμένη έρευνα είναι μια πιλοτική έρευνα που συνδυάζει για πρώτη φορά την επίδραση συγκεκριμένων συγκεντρώσεων βιταμίνης D και την διαδικασία της κατάψυξης- απόψυξης. Επομένως, προκειμένου το συμπέρασμα να είναι πιο ασφαλές, θα μπορούσε μελλοντικά να προκύψει μια έρευνα με μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων σαφώς αλλά και με περισσότερες διαφορετικές συγκεντρώσεις βιταμίνης D, κυρίως μεγαλύτερες εφόσον παρατηρήσαμε μια ευεργετική δράση στην μεγαλύτερη συγκέντρωση του πειράματος μας.

Επιπλέον, θα ήταν φρόνιμο σε μια επικείμενη έρευνα με ανάλογο περιεχόμενο να κατηγοριοποιηθούν τα δείγματα σπέρματος σε κατηγορίες ανάλογο με την συγκέντρωση και την κινητικότητα τους, έτσι ώστε να διεξαχθεί ένα πιο ειδικό και εμπειριστατώμενο συμπέρασμα σχετικό με τις διάφορες κατηγορίες ανδρικής υπογονιμότητας που παρατηρούνται.

Η υπογονιμότητα είναι ένα πρόβλημα που μαστίζει στις μέρες μας και θα συνεχίζει να αυξάνεται όσο η ρυθμοί και η ποιότητα ζωής σιγά σιγά μειώνονται. Στόχος μας είναι να διασφαλίσουμε με όποιο τρόπο μπορούμε και με τα μέσα που έχουμε, την επιλογή και την ικανότητα του κάθε ζευγαριού να χρησιμοποιεί τις καλύτερες δυνατές πιθανότητες προκειμένου να επιτύχει μια εγκυμοσύνη.

## 8 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Πέτρος Λ. Καρκαλούσος, 2009, Ανάλυση Βιολογικών Υγρών και Εκκρινμάτων, Αθήνα, Έκδοση 1<sup>η</sup>
2. Μαρία Μυρωνίδου- Τζουβελέκη, Ενότητα 8: Βιταμίνες- Ιχνοστοιχεία, Φαρμακολογία, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης
3. Γ. Α. Βάρβογλη, Ν. Ε. Αλεξάνδρου, Οργανική Χημεία, έκδοση Ε΄, 1971
4. Διβανόγλου Ναταλία, Η βιταμίνη D και ο υποδοχέας της, Πτυχιακή Εργασία, Σεπτέμβριος 2014, Θεσσαλονίκη
5. Shigeaki Kato, The Function of Vitamin D Receptor in Vitamin D Action, Institute of Molecular and Cellular Biosciences The University of Tokyo, January 2000
6. J. Wesley Pike, Ph.D. and Mark B. Meyer, Ph.D, The Vitamin D Receptor: New Paradigms for the Regulation of Gene Expression by 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>, *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2010, June ;39(2) : 255-269
7. Φιλίππιδου Σωτηρία, Κρυοσυντήρηση φυτικού γενετικού υλικού in vitro, Πτυχιακή Εργασία, ΤΕΙ Κρήτης, Ηράκλειο 2004
8. Donnelly ET1, McClure N, Lewis SE., Cryopreservation of human semen and prepared sperm: effects on motility parameters and DNA integrity, *Fertil Steril.* 2001 Nov;76(5):892-900.
9. Sherman J. Cryopreservation of human semen, 1990, in: *Handbook of the Laboratory Diagnosis and Treatment of Infertility*, Keel b and Webster BW Eds, CRC Press, Boca Raton, Fla, USA.
10. Shufaro Y, Schenker JG. Cryopreservation of human genetic material, *Annals of The New York Academy of Sciences* 2010, 1205:220-4
11. Di Santo M, Tarozzi N, Nadalini M, Borini A., Human Sperm Cryopreservation: Update on techniques, effect on DNA integrity and implications for ART. *Adv Urol*, 2012; article ID854837, 1-12.
12. Mohammad Baqer Minaei, Ph.D., Mohammad Barbarestani, Ph.D., Saeid Nekoonam, M.Sc., Mir Abbas Abdolvahabi, Ph.D., Nasrin Takzare, M.Sc., Mohammad Hossein Asadi, Ph.D., Azim Hedayatpour, M.Sc., and Fardin Amidi, Ph.D, Effect of Trolox addition to cryopreservation media on human sperm motility, *Iran J Reprod Med.* 2012 Mar; 10(2): 99–104.
13. Taylor K, Roberts P, Sanders K, Burton P. Effect of antioxidant supplementation of cryopreservation medium on post-thaw integrity of human spermatozoa. *Reprod Biomed Online.* 2009;18:184–189.
14. Jeong Y, Kim M, Song H, Kang E, Ock S, Mohana Kumar B, et al. Effect of -tocopherol supplementation during boar semen cryopreservation on sperm characteristics and expression of apoptosis related genes. *Cryobiology.* 2009;58:181–189.
15. Eilish T Donnelly, Ph.D., Neil McClure, M.D., Sheena E.M Lewis, Ph.D., Cryopreservation of human semen and prepared sperm: effects on motility



- parameters and DNA integrity, *Fertility and Sterility*, November 2001, Volume 76, Issue 5, Pages 892–900
16. Weidel, L and Prins, G.S. Cryosurvival of human spermatozoa frozen in eight different buffer systems. *J Androl.* 1987; 8: 41–47
  17. Twigg, J.P, Irvine, D.S, and Aitken, R.J. Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1998; 13: 1864–1871
  18. Cathcart, R, Schwiers, E, Saul, R.L, and Ames, B.N. Thymine glycol and thymidine glycol in human and rat urine—a possible assay for oxidative DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1984; 81: 5633–5637
  19. Weidel, L and Prins, G.S. Cryosurvival of human spermatozoa frozen in eight different buffer systems. *J Androl.* 1987; 8: 41–47
  20. Sinan Ozkavukcu, Esra Erdemli, Ayca Isik, Derya Oztuna, Sercin Karahuseyinoglu, Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa, *J Assist Reprod Genet* (2008) 25:403–411
  21. Hammadeh ME, Askari AS, Georg T, Rosenbaum P, Schmidt W., Effect of freeze–thawing procedure on chromatin stability, morphological and membrane integrity of human spermatozoa in fertile and subfertile men. *Int J Androl* 1999;22:155–62.
  22. Morris GJ. Rapidly cooled human sperm: no evidence of intracellular ice formation. *Hum Reprod* 2006;21:2075–83.
  23. Escalier D, Bisson JP. Quantitative ultrastructural modifications in human spermatozoa after freezing. In: David G, Price WS, editors., *Human artificial insemination and semen preservation*. New York: Plenum; 1980. p. 107–122.
  24. Medeiros CMO, Forell F, Oliveira ATD, Rodrigues JL. Current status of sperm cryopreservation: Why isn't it better?, *Theriogenology*, 2002;57:327–44.
  25. Meseguer M, Molina N, Garcia-Velasco JA, Remohi J, Pellicer A, Garrido N. Sperm cryopreservation in oncological patients: a 14- year follow-up study. *Fertil Steril* 2006;85:640–5.
  26. Zhang, H.B., Lu, S.M., Ma, C.Y., Wang, L., Li, X., and Chen, Z.J. Early apoptotic changes in human spermatozoa and their relationships with conventional semen parameters and sperm DNA fragmentation. *Asian J Androl.* 2008; 10: 227–235
  27. Gürler, H., Malama, E., Heppelmann, M., Calisici, O., Leiding, C., Kastelic, J. et al. Effects of cryopreservation on sperm viability, synthesis of reactive oxygen species and DNA damage of bovine sperm. *Theriogenology*. 2016; 86: 562–571
  28. Gadea, J., Molla, M., Selles, E., Marco, M.A., Garcia-Vazquez, F.A., and Gardon, J.C. Reduced glutathione content in human sperm is decreased

- after cryopreservation: effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Cryobiology*. 2011; 62: 40–46
29. Tahereh Rahiminia, Akram Hosseini, Morteza Anvari, Saeed Ghasemi-Esmailabad, Ali Reza Talebi, Modern human sperm freezing: Effect on DNA, chromatin and acrosome integrity, Research and Clinical Center for Infertility, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Iran, August 2017, Volume 56, Issue 4, Pages 472–476
  30. M. O'Connell N. McClure S.E.M. Lewis, The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function, *Human Reproduction*, Volume 17, Issue 3, 1 March 2002, Pages 704–709
  31. Holt, W.V. (1997) Alternative strategies for the long-term preservation of spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.* , 9, 309–319
  32. Watson, P.F. (1995) Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.* , 7, 871–891.
  33. Donnelly, E.T, Lewis, S.E.M., McNally, J. and Thompson, W. (1998) In vitro fertilization and pregnancy rates: the influence of sperm motility and morphology on IVF outcome. *Fertil. Steril.* , 70, 305–314.
  34. Kao, S.H., Chao, H.T. and Wei, Y.H. (1998) Multiple deletions of mitochondrial DNA are associated with the decline of motility and fertility of human spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.* , 4, 657–666.
  35. Nicholas L.Cross and Stephen E.Hanks, Effects of cryopreservation on human sperm acrosomes, Division of Reproductive Biology and Medicine, Department of Obstetrics and Gynecology, University of California, Davis, CA 95616, USA, *Human Reproduction* vol.6 no.9 pp.1279-1283, 1991
  36. Nassira Zribi , Nozha Feki Chakroun , Fatma Ben Abdallah , Henda Elleuch , Afifa Sellami , Jalel Gargouri , Tarek Rebai , Faiza Fakhfakh , Leila Ammar Keskes , Effect of freezing–thawing process and quercetin on human sperm survival and DNA integrity, *Cryobiology* 65 (2012) 326–331
  37. T.S. De Paula, R.P. Bertolla, D.M. Spaine, M.A. Cunha, N. Schor, A.P. Cedenho, Effect of cryopreservation on sperm apoptotic deoxyribonucleic acid fragmentation in patients with oligozoospermia, *Fertil. Steril.* 86 (2006) 597–600.
  38. V. Isachenko, E. Isachenko, I.I. Katkov, M. Montag, S. Dessole, F. Nawroth, H., Van Der Ven, Cryoprotectant-free cryopreservation of human spermatozoa by vitrification and freezing in vapour: effect on motility, DNA integrity, and fertilization ability, *Biol. Reprod.* 71 (2004) 1167–1173.
  39. P.F. Watson, The causes of reduced fertility with cryopreserved semen, *Anim.Reprod. Sci.* 60–61 (2000) 481–492.



40. U. Paasch, R.K. Sharma, A.K. Gupta, S. Grunewald, E.J. Mascha, A.J. Thomas, H.J. Glander, A. Agarwal, Cryopreservation and thawing is associated with varying extend of activation of apoptotic machinery in subsets of ejaculated human spermatozoa, *Biol. Reprod.* 71 (2004) 1828–1837.
41. T.M. Said, A. Gaglani, A. Agarwal, Implication of apoptosis in sperm cryoinjury, *Reprod. Biomed. Online* 21 (2010) 456–462.
42. E.C. Silva, J.F. Cajueiro, S.V. Silva, P.C. Soares, M.M. Guerra, Effect of antioxidants resveratrol and quercetin on in vitro evaluation of frozen ram sperm, *Theriogenology* 77 (2012) 1722–1726
43. S. Sinclair, Male infertility: nutritional and environmental considerations, *Altern. Med. Rev.* 5 (2000) 28–38
44. Bouillon R1, Carmeliet G, Verlinden L, van Etten E, Verstuyf A, Luderer HF, Lieben L, Mathieu C, Demay M., Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice, *Endocr Rev.* 2008 Oct;29(6):726-76.
45. Blomberg Jensen M, Bjerrum PJ, Jessen TE, Nielsen JE, Joensen UN, Olesen IA, Petersen JH, Juul A, Dissing S, Jørgensen N., Vitamin D is positively associated with sperm motility and increases intracellular calcium in human spermatozoa, *Hum Reprod.* 2011 Jun;26(6):1307-17.
46. Blomberg Jensen M, Nielsen JE, Jørgensen A, Rajpert-De Meyts E, Kristensen DM, Jørgensen N, Skakkebaek NE, Juul A, Leffers H., Vitamin D receptor and vitamin D metabolizing enzymes are expressed in the human male reproductive tract, *Hum Reprod.* 2010 May;25(5):1303-11.
47. Nangia AK, Hill O, Waterman MD, Schwender CE, Memoli V. Testicular maturation arrest to testis cancer: spectrum of expression of the vitamin D receptor and vitamin D treatment in vitro, *J Urol* , 2007, vol. 178 (pg. 1092-1096)
48. Uhland AM, Kwiecinski GG, DeLuca HF. Normalization of serum calcium restores fertility in vitamin D-deficient male rats, *J Nutr* , 1992, vol. 122 (pg. 1338-1344)
49. Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, van EE, Verstuyf A, Luderer HF, Lieben L, Mathieu C, Demay M. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice, *Endocr Rev* , 2008, vol. 29 (pg. 726-776)
50. Bedu-Addo K, Costello S, Harper C, hado-Oliveira G, Lefievre L, Ford C, Barratt C, Publicover S. Mobilisation of stored calcium in the neck region of human sperm—a mechanism for regulation of flagellar activity, *Int J Dev Biol* , 2008, vol. 52 (pg. 615-626)
51. Aquila S, Guido C, Middea E, Perrotta I, Bruno R, Pellegrino M, Ando S. Human male gamete endocrinology: 1alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 (1,25(OH)2D3) regulates different aspects of human sperm biology and metabolism, *Reprod Biol Endocrinol* , 2009, vol. 7 pg. 140

## ΙΣΤΟΤΟΠΟΙ

- Ιστότοπος NIH :  
<https://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminD-HealthProfessional/>
- Ιστότοπος Μονάδας Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής Newlife  
<http://www.newlife-ivf.gr/ypogonimotita>
- Ιστότοπος Ανδρολογικού Ινστιτούτου Αθηνών  
[https://andrologia.gr/service/ypogonimotita/?gclid=EAIaIQobChMI68fdxruf1gIVyCnTCh3zpA2pEAAYAyAAEgJhKfD\\_BwE](https://andrologia.gr/service/ypogonimotita/?gclid=EAIaIQobChMI68fdxruf1gIVyCnTCh3zpA2pEAAYAyAAEgJhKfD_BwE)
- Ιστότοπος ΙΜΟΠ  
<http://www.imop.gr/provlhmata-gonimothtas/h-antrikh-ypogonimothta>
- Ιστότοπος Μονάδας Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής EmBIO  
<https://www.ivf-embryo.gr/exosomatiki-ivf/andrikos-paragontas/andriki-ypogonimotita/andriki-ypogonimotita>
- Ιστότοπος Μονάδας Εξωσωματικής Γονιμοποίησης EYTONIA  
<http://www.eugonia.com.gr/ypogonimotita/diagnosi/andres/spermodiagramma>
- Ιστότοπος : [http://mariin.ru/uploads/vrt\\_02.pdf](http://mariin.ru/uploads/vrt_02.pdf)
- Ιστότοπος : WHO laboratory manual  
([http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44261/1/9789241547789\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44261/1/9789241547789_eng.pdf?ua=1))
- Ιστότοπος : <http://vitamines-metalla.blogspot.gr/2012/08/blog-post.html>
- Ιστότοπος :  
<https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%92%CE%B9%CF%84%CE%B1%CE%B7%CE%AF%CE%BD%CE%B7>
- Ιστότοπος Κλινικού Εργαστηρίου Chem-Lab :  
<http://www.chem-lab.com.cy/el>

## ΕΙΚΟΝΕΣ

- Εικόνα 1 :  
<http://slideplayer.gr/slide/3627148/11/images/10/%CE%A0%CE%BF%CE%B9%CE%B1+%CE%BC%CE%AD%CF%84%CF%81%CE%B7%CF%83%CE%B7+%CF%80%CF%81%CE%AD%CF%80%CE%B5%CE%B9+%CE%BD%CE%B1+%CE%B3%CE%AF%CE%BD%CE%B5%CE%B9+%CF%80%CF%81%CF%8E%CF%84%CE%B7+%CF%83%CF%84%CE%BF+%CE%B4%CE%B5%CE%AF%CE%B3%CE%BC%CE%B1+%CF%83%CF%80%CE%AD%CF%81%CE%BC%CE%B1%CF%84%CE%BF%CF%82;.jpg>
- Εικόνα 2 :  
[http://www.microopticsl.com/wp-content/uploads/2014/04/disposables\\_new\\_makler\\_chamber.png](http://www.microopticsl.com/wp-content/uploads/2014/04/disposables_new_makler_chamber.png)
- Εικόνα 3 :



[http://www.hygeia.gr/media/inlinepics/articlefiles/955-2610-vitamines\\_pinakes.jpg](http://www.hygeia.gr/media/inlinepics/articlefiles/955-2610-vitamines_pinakes.jpg)

- Εικόνα 4 :  
<https://image.slidesharecdn.com/iuineu-140808124506-phpapp02/95/intra-uterine-insemination-38-638.jpg?cb=1407502039>  
<https://ivfmadesimple.files.wordpress.com/2012/06/maklergrid.gif?w=600>
- Εικόνα 5 :  
[https://st2.depositphotos.com/3056501/12443/i/950/depositphotos\\_124434606-stock-photo-molecular-structure-of-cholecalciferol-vitamin.jpg](https://st2.depositphotos.com/3056501/12443/i/950/depositphotos_124434606-stock-photo-molecular-structure-of-cholecalciferol-vitamin.jpg)  
[https://st2.depositphotos.com/3056501/12443/i/950/depositphotos\\_124434566-stock-photo-molecular-structure-of-ergocalciferol-vitamin.jpg](https://st2.depositphotos.com/3056501/12443/i/950/depositphotos_124434566-stock-photo-molecular-structure-of-ergocalciferol-vitamin.jpg)
- Εικόνα 6 :  
<https://opencourses.auth.gr/modules/document/file.php/OCRS154/%CE%A0%CE%B1%CF%81%CE%BF%CF%85%CF%83%CE%B9%CE%AC%CF%83%CE%B5%CE%B9%CF%82%20%CE%9C%CE%B1%CE%B8%CE%AE%CE%BC%CE%B1%CF%84%CE%BF%CF%82%07.%20%CE%92%CE%B9%CF%84%CE%B1%CE%BC%CE%AF%CE%BD%CE%B5%CF%82%%.pdf>